

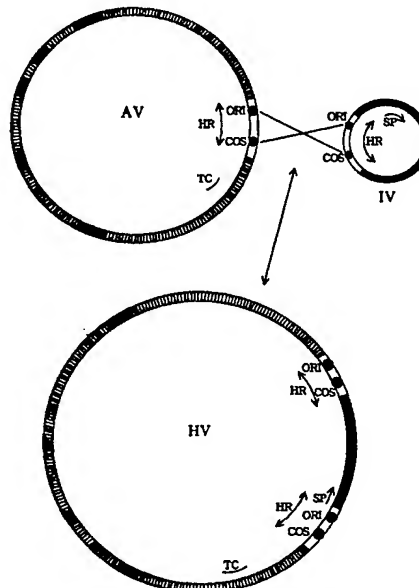


特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 ⁶ C12N 15/00, A01H 1/00 // C12N 5/00, 1/21	A1	(11) 国際公開番号 WO 95/16031 (43) 国際公開日 1995年6月15日 (15.06.95)
(21) 国際出願番号 PCT/JP94/02049 (22) 国際出願日 1994年12月6日(06. 12. 94) (30) 優先権データ 特願平5/340657 1993年12月8日(08. 12. 93) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 日本たばこ産業株式会社 (JAPAN TOBACCO INC.) [JP/JP] 〒140 東京都品川区東品川四丁目12番62号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 小鞠敏彦 (KOMARI, Toshihiko) [JP/JP] 斎藤靖人 (SAITO, Yasuhiro) [JP/JP] 樋江井祐弘 (HIEI, Yukoh) [JP/JP] 〒438 静岡県磐田郡豊田町東原700 日本たばこ産業株式会社 遺伝育種研究所内 Shizuoka, (JP) (74) 代理人 弁理士 谷川英次郎 (TANIGAWA, Hidejiro) 〒102 東京都千代田区飯田橋4丁目5番12号 岩田ビル6階 谷川国際特許事務所 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AU, CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書		

(54) Title : METHOD OF TRANSFORMING PLANT AND VECTOR THEREFOR**(54) 発明の名称** 植物の形質転換方法及びそのためのベクター**(57) Abstract**

A method of plant transformation whereby a regenerated transgenic plant containing desired genes introduced thereinto is prepared at a high efficiency and which permits the preparation in the subsequent generation of a transgenic plant containing the desired genes but not the drug-resistant genes used as the selection marker. The method comprises transforming a plant by means of agrobacteria and is characterized by cotransforming plant cells with a first T-DNA(1) which functions in plants and contains the drug-resistant genes and a second T-DNA(2) which is contained in the following hybrid vector and contains, inserted therein, desired DNA fragments to be introduced into the plant. The hybrid vector is one prepared by the homologous recombination between the following acceptor vector and the following intermediate vector in agrobacteria. The acceptor vector contains at least (a) a DNA region having the function of plasmid replication which is effective in agrobacteria and colibacilli, (b) a DNA region containing vir B and vir G genes of the virulent region of Ti plasmid pTiBo542 of *Agrobacterium tumefaciens*, and (c) a DNA region which is homologous with part of the following intermediate vector and is capable of homologous recombination via that part in agrobacteria. The intermediate vector contains at least (i) a DNA region having the function of plasmid replication which is effective in colibacilli but ineffective in agrobacteria, (ii) a DNA region which is homologous with part of the above acceptor vector and is capable of homologous recombination via that part in agrobacteria, and (iii) a DNA region which constitutes at least part of the second T-DNA(2).



(57) 要約

高い効率で所望の遺伝子が導入された再生した形質転換植物を作成し、次世代において該所望の遺伝子を含むが、選択マーカーとして用いる薬剤耐性遺伝子を含まない形質転換植物を得ることを可能とする植物の形質転換方法が開示されている。下記第1のT-DNA(1)と下記第2のT-DNA(2)によって植物細胞を共形質転換し、薬剤耐性となった細胞を選択することを特徴とする、アグロバクテリウム属細菌を介する植物の形質転換方法を提供する。(1)植物中で機能する、上記薬剤耐性を付与する薬剤耐性遺伝子を含む第1のT-DNA。(2)下記ハイブリッドベクター中に含まれ、植物に導入すべき所望のDNA断片が内部に挿入された第2のT-DNA。上記ハイブリッドベクターは、下記アクセプターベクターと下記中間ベクターとの、アグロバクテリウム属細菌中での相同組換えによって調製されたものである。上記アクセプターベクターは、少なくとも、

(a)アグロバクテリウム属細菌中および大腸菌中で有効なプラスミド複製機能を有するDNA領域と、(b)Agrobacterium tumefaciensのTiプラスミドpTiBo542のヴィルレンス領域のvirBおよびvirG遺伝子を含むDNA領域と、

(c)下記中間ベクターの一部と相同であり、この部分を介してアグロバクテリウム属細菌中で相同組換えの可能なDNA領域を含むものである。上記中間ベクターは、少なくとも、(i)大腸菌中では機能するが、アグロバクテリウム属細菌中では機能しないプラスミド複製機能を有するDNA領域と、(ii)上記アクセプターベクターの一部と相同であり、この部分を介してアグロバクテリウム属細菌中で相同組換えの可能なDNA領域と、(iii)上記第2のT-DNAの少なくとも一部を構成するDNA領域を含むものである。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
AT	オーストリア	ES	スペイン	LR	リベリア	SD	スーダン
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BB	バルバドス	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BE	ベルギー	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア
BF	ブルキナ・ファソ	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロヴァキア共和国
BG	ブルガリア	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	ML	マリ	TD	チャド
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TG	トゴ
CA	カナダ	IE	アイルランド	MR	モリタニア	TJ	タジキスタン
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MW	マラウイ	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴ	IT	イタリア	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	JP	日本	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NO	ノルウェー	US	米国
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NZ	ニュージーランド	UZ	ウズベキスタン共和国
CZ	チェコ共和国	KR	大韓民国	PL	ポーランド	VN	ベトナム
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	LI	リヒテンシュタイン	RO	ルーマニア		

明細書

植物の形質転換方法及びそのためのベクター

技術分野

本発明は、植物の形質転換方法及びそのためのベクターに関する。

背景技術

高等植物に外来遺伝子を導入する方法（形質転換法）には、大別して、直接導入法、とアグロバクテリウム属細菌を介する方法がある。前者には、電気刺激を用いる方法（エレクトロポレーション法、エレクトロインジェクション法）、PEGなどの化学的な処理による方法、遺伝子銃を用いる方法などが含まれる。前者は、従来後者が利用しにくかった単子葉植物に多く用いられている方法である。後者は、*Agrobacterium tumefaciens* や *A. rhizogenes* などのアグロバクテリウム属細菌の有する高等植物細胞形質転換能力を利用した方法である。後者は、比較的大きくかつ両端の定まったDNA断片を効率良く高等植物に導入でき、かつ、プロトプラスト培養など特殊な培養技術を必要としない優れた方法である。後者は、双子葉植物に多く用いられている方法であるが、近年では、単子葉植物についても利用が始まっている。

形質転換法は、高等植物の遺伝子工学や分子生物学の研究において必須の手法となっており、任意のDNA断片を効率良く植物細胞に導入し、効率良くそのDNA断片を含む植物体を得る方法が必要とされている。遺伝子導入の際、外来遺伝子の導入された植物細胞を、外来遺伝子が導入されていない植物細胞から選り出す方法が必要である。通常は、後者の細胞がはるかに多いため、検出の容易な遺伝子を選抜マーカーとして用いる必要がある。選抜マーカーとして最も多く用いられているのが、薬剤耐性遺伝子である。例として、カナマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子などの抗生物質耐性遺伝子や、バスタ耐性遺伝子、ラウンドアップ耐性遺伝子など除草剤耐性遺伝子があげられる。

薬剤耐性遺伝子を選抜マーカーとして用いる場合、通常は、植物に導入する任意のDNA断片と薬剤耐性遺伝子を接続し、この接続遺伝子を植物に導入する操作を行ない、薬剤耐性細胞を選抜し、さらに薬剤耐性の植物体を再生して形質転換植物を得ることが行なわれている。このような形質転換植物には、薬剤耐性遺

伝子と接続した任意のDNA断片も同時に導入されているのである。

しかしながら、この方法には2つの問題点がある。すなわち、

1. 選抜マーカーは導入操作の時だけに必要であるのに、これ以後の生長過程、さらには後代の植物においても、常に導入した任意のDNA断片と挙動を伴にする。そのために、不要な遺伝子を含む形質転換植物が得られてしまうことになる。とくに作物育種に形質転換法を利用した場合、このような不要な遺伝子を含まない品種の方が、より受入れられやすいと考えられるので、大きな問題となる。また、形質転換植物に、さらに、他のDNA断片を導入する場合、別の選抜マーカーを用いる必要があるという不便を生み、大きな問題である。
2. 選抜マーカーと植物に導入する任意のDNA断片を接続する操作が必要であるため、導入遺伝子構築操作において1段階の余分な操作を行わなくてはならない。

これらの問題点を回避するために、直接導入法の場合には、いわゆる共形質転換法(co-transformation法)が開発され、広く用いられている(Shimamoto ら、Nature 338:274-276、1989)。この方法では、選抜マーカーの薬剤耐性遺伝子のDNAと植物に導入する任意のDNA断片とを接続しないで、単に混合し植物細胞に導入するのである。そして、薬剤耐性の植物を選抜すると、その中には、薬剤耐性遺伝子のDNAと植物に導入する任意のDNA断片とがともに含まれている植物も存在するのである。2種のDNAの混合比を調整することにより、薬剤耐性植物に占める2種のDNAの含まれる植物の割合が50%以上となることが多い。

このようにして導入された2種のDNA断片は、接続されていないので、独立に遺伝し次世代において分離するため、次世代において選抜マーカーを含まず導入した任意のDNA断片のみが含まれる形質転換植物を得ることができるのである。

アグロバクテリウム属細菌によって植物に導入されるDNA断片は通常T-DNA (transfer DNA) と呼ばれ、右ボーダーおよび左ボーダーと呼ばれる反復配列を両端に持つことが特徴である。また、左右ボーダー配列と任意のDNAとによって作成した人工的なDNA断片もT-DNAと呼ぶことができる。野生の

アグロバクテリウム属細菌には2種のT-DNAを含むものも多く、このような細菌によって形質転換された植物細胞には2種のT-DNAが含まれているので、共形質転換の現象自体は古くから知られていた。

しかし、現在用いられているアグロバクテリウム属細菌を介する形質転換法の基本となっている技術（特開昭60-70080；特公平2-58917；Herrera-Estrellaら、The EMBO Journal 6:987-995、1983；Bevanら、Nature 304:184-187、1983；Fraleyら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:4803-4807、1983）、ならびに、改良された高効率の形質転換技術（Komari、Plant Cell Reports 9:303-306、1990）では、2種のT-DNAを植物に導入する方法についての言及はされていない。

2種のT-DNAを同時に植物に導入する方法として、

1. 第1のT-DNAと第2のT-DNAを同一のアグロバクテリウム属細菌中に配置する場合

2. 第1のT-DNAと第2のT-DNAを別々のアグロバクテリウム属細菌中に配置し2種のアグロバクテリウム属細菌を混合して用いる場合

とがありうる。そして、どちらの場合でも、植物に導入された2種のT-DNAは独立に遺伝し、次世代において分離することが示された（Depickerら、Mol. Gen. Genet. 201:477-484、1985；de Framondら、Mol. Gen. Genet. 202:125-131、1986；McKnightら、Plant Molecular Biology 8:439-445、1987）。

しかしながら、これらの従来技術では、2種のT-DNAがともに導入されさらに再生した植物体を得ることのできる効率が低いために、アグロバクテリウム属細菌を介した共形質転換法は広く用いられるに至っていないのである。

発明の開示

本発明の目的は、高い効率で所望の遺伝子が導入された再生した形質転換植物を作成し、次世代において該所望の遺伝子を含むが、選択マーカーとして用いる薬剤耐性遺伝子を含まない形質転換植物を得ることを可能とする植物の形質転換方法を提供することである。また、本発明の目的は、この方法に用いられるベクターを提供することである。

本願発明者らは、鋭意研究の結果、アグロバクテリウム属細菌を介する高等植

物の形質転換法において、選抜マーカーとして薬剤耐性遺伝子を含む第1のT-DNAと、植物に導入すべき任意のDNA断片が挿入された第2のT-DNAとを共形質転換法により同時に高等植物に導入し、薬剤耐性植物を選抜することにより、上記目的を達成することができることを見出し本発明を完成した。

すなわち、本発明は、下記第1のT-DNA(1)と下記第2のT-DNA(2)によって植物細胞を共形質転換し、薬剤耐性となった細胞を選択することを特徴とする、アグロバクテリウム属細菌を介する植物の形質転換方法を提供する。

(1) 植物中で機能する、上記薬剤耐性を付与する薬剤耐性遺伝子を含む第1のT-DNA。

(2) 下記ハイブリッドベクター中に含まれ、植物に導入すべき所望のDNA断片が内部に挿入された第2のT-DNA。

上記ハイブリッドベクターは、下記アクセプターベクターと下記中間ベクターとの、アグロバクテリウム属細菌中での相同組換えによって調製されたものである。

上記アクセプターベクターは、少なくとも、

(a) アグロバクテリウム属細菌中および大腸菌中で有効なプラスミド複製機能を有するDNA領域と、

(b) *Agrobacterium tumefaciens* のTiプラスミドpTiBo542のヴィルレンス領域のvirBおよびvirG遺伝子を含むDNA領域と、

(c) 下記中間ベクターの一部と相同であり、この部分を介してアグロバクテリウム属細菌中で相同組換えの可能なDNA領域を含むものである。

上記中間ベクターは、少なくとも、

(i) 大腸菌中では機能するが、アグロバクテリウム属細菌中では機能しないプラスミド複製機能を有するDNA領域と、

(ii) 上記アクセプターベクターの一部と相同であり、この部分を介してアグロバクテリウム属細菌中で相同組換えの可能なDNA領域と、

(iii) 上記第2のT-DNAの少なくとも一部を構成するDNA領域を含むものである。

また、本発明は、(1) 植物中で機能する薬剤耐性遺伝子を含む第1のT-DNAと、

(2) 制限酵素認識部位を有する第2のT-DNAとを含むハイブリッドベクターを提供する。

該ハイブリッドベクターは、下記アクセプターベクターと下記中間ベクターとの、アグロバクテリウム属細菌中での相同組換えによって調製されたものである。

上記アクセプターベクターは、少なくとも、

(a) アグロバクテリウム属細菌中および大腸菌中で有効なプラスミド複製機能を有するDNA領域と、

(b) *Agrobacterium tumefaciens* のTiプラスミドpTiBo542のヴィルレンス領域のvirBおよびvirG遺伝子を含むDNA領域と、

(c) 下記中間ベクターの一部と相同であり、この部分を介してアグロバクテリウム属細菌中で相同組換えの可能なDNA領域を含むものである。

上記中間ベクターは、少なくとも、

(i) 大腸菌中では機能するが、アグロバクテリウム属細菌中では機能しないプラスミド複製機能を有するDNA領域と、

(ii) 上記アクセプターベクターの一部と相同であり、この部分を介してアグロバクテリウム属細菌中で相同組換えの可能なDNA領域と、

(iii) 上記第2のT-DNAの少なくとも一部を構成するDNA領域を含むものである。

本発明によれば、高い効率で所望の遺伝子が導入された再生した形質転換植物を作成し、次世代において該所望の遺伝子を含むが、選択マーカーとして用いる薬剤耐性遺伝子を含まない形質転換植物を得ることが可能になる。

図面の簡単な説明

図1は、アグロバクテリウム属細菌中での相同組換えにより、アクセプターベクターと中間ベクターから、ハイブリッドベクターが調製される現象を模式的に示した図である。

図 2 は、pSB21 の構成を示す図である。

図 3 は、pSB22 の構成を示す図である。

図 4 は、pSB24 の構成を示す図である。

図 5 は、pNB1の構成を示す図である。

図 6 は、pSB1の構成を示す図である。

図 7 は、pSB3の構成を示す図である。

図 8 は、pSB4の構成を示す図である。

図 9 は、pNB1とpSB24 の相同組換えにより調製されるpNB124の構成を示す図である。

図 10 は、pSB1とpSB24 の相同組換えにより調製されるpSB124の構成を示す図である。

図 11 は、pSB3とpSB24 の相同組換えにより調製されるpSB324の構成を示す図である。

図 12 は、pSB4とpSB24 の相同組換えにより調製されるpSB424の構成を示す図である。

図 13 は、pGA482-GUSの構成を示す図である。

図 14 は、pTOK253 の構成を示す図である。

なお、上記図中に記載されている参照符号の意味を以下に記す。

AV アクセプターベクター

IV 中間ベクター

HV ハイブリッドベクター

HR アクセプターベクターとハイブリッドベクターにともに含まれる断片であり、この断片中のDNA配列の間で相同組換えが起きる。

ORI ColE1 の複製開始点

COS ラムダファージのCOS 部位

SP 大腸菌中ならびにアグロバクテリウム属細菌中で機能するスペクチノマイシン耐性遺伝子

TC 大腸菌中ならびにアグロバクテリウム属細菌中で機能するテトラサイクリン耐性遺伝子

KAN 大腸菌中ならびにアグロバクテリウム属細菌中で機能するカナマイシン耐性遺伝子

NPT 植物細胞中で機能するNOS プロモーターを接続したカナマイシン耐性遺伝子。大腸菌ならびにアグロバクテリウム属細菌にも低レベルの耐性を付与する。

HPT 植物細胞中で機能する35S プロモーターを接続したハイグロマイシン耐性遺伝子。アグロバクテリウム属細菌にも低レベルの耐性を付与する。

GUS 植物細胞中で機能する35S プロモーターを接続したG U S 遺伝子

I-GUS 植物細胞中で機能する35S プロモーターを接続した、イントロンを含むG U S 遺伝子

T-DNA アグロバクテリウム属細菌から植物に転移するD N A断片

BR T-DNAの右ボーダー配列

BL T-DNAの左ボーダー配列

15.2 kb KpnI pTiBo542のヴィルレンス領域由来の15.2 kb KpnI 断片

B pTiBo542のvirB遺伝子

G pTiBo542のvirG遺伝子

発明を実施するための最良の形態

本発明の方法により形質転換できる植物は、アグロバクテリウム属細菌に感染し、それによって形質転換されるいかなる植物であってもよく、例として、タバコ、イネ、トマト、ジャガイモ、ペチュニア、トウモロコシ及びアブラナ等の種々の高等植物を挙げることができるがこれらに限定されるものではない。

アグロバクテリウム属細菌を介する高等植物の形質転換方法自体はこの分野において周知である。形質転換に用いることができるアグロバクテリウム属細菌として、*Agrobacterium tumefaciens* 及び *Agrobacterium rhizogenes* 等を挙げることができる。これらのアグロバクテリウム属細菌は植物細胞を形質転換し、腫瘍化する能力を有する土壌細菌であり、これらの細菌には腫瘍誘導性プラスミド (T i プラスミド) が含まれている。T i プラスミドにおいて重要な部位は形質転換に関与する領域であるヴィルレンス領域と、植物細胞に転移される腫瘍化遺伝子が含まれている T-DNA 領域である。そして、T-DNA 領域において

は、腫瘍化遺伝子の転移に必須の部分はその両端に位置する境界配列と呼ばれる領域のみである。従って、従来より、アグロバクテリウム属細菌を介する植物の形質転換方法においては、このT-DNA中に所望の遺伝子を挿入したプラスミドを含むアグロバクテリウム属細菌に植物を感染させることにより形質転換を行っている。本発明の方法においても、植物に導入する薬剤耐性遺伝子及び所望の任意の遺伝子はそれぞれT-DNA中に挿入される。

本発明の方法では、選択マーカーとして用いる薬剤耐性遺伝子を含む第1のT-DNAと、植物に導入しようとする所望のDNA断片が導入された第2のT-DNAとにより植物を共形質転換する。第1のT-DNA中に含まれる薬剤耐性遺伝子としては、カナマイシン耐性遺伝子又はハイグロマイシン耐性遺伝子が好ましいがこれらに限定されるものではない。第1及び第2のT-DNAのうち、少なくとも第2のT-DNAは後述するハイブリッドベクター上に存在する。

ハイブリッドベクターは、アクセプターベクターと中間ベクターとのアグロバクテリウム属細菌中での相同組換えにより調製されるものである。ここで、アクセプターベクターは、アグロバクテリウム属細菌中および大腸菌中で複製され増殖するプラスミドであって、中間ベクターと相同なDNA断片を含み、アグロバクテリウム属細菌中でのこの部位を介した相同組換えによって、中間ベクターを組込むことのできるプラスミドである。また、中間ベクターは、大腸菌中では複製され増殖するが、アグロバクテリウム属細菌中では単独では複製されず増殖しないプラスミドであって、アクセプターベクターと相同なDNA断片を含み、この部位を介した相同組換えによって、アクセプターベクターに組込まれることができ、組込まれた状態でアグロバクテリウム属細菌中で維持することのできるプラスミドである。

上記アクセプターベクター上には、

- (a) アグロバクテリウム属細菌中および大腸菌中で有効なプラスミド複製機能を有するDNA領域と、
- (b) *Agrobacterium tumefaciens* のTiプラスミドpTiBo542のヴィルレンス領域のvirBおよびvirG遺伝子を含むDNA領域と、
- (c) 下記中間ベクターの一部と相同であり、この部分を介してアグロバクテリ

ウム属細菌中で相同組換えの可能なDNA領域とが存在する。

ここで、TiプラスミドpTiBo542は、*Agrobacterium tumefaciens* A281 (ATCC 37349)に含まれるTiプラスミドであって、そのヴィルレンス領域の能力が高いことで知られるものである（フッドら、*Bio/Technol.* 2:702-709, 1984; フッドら、*J. Bacteriol.*, 168:1283-1209, 1986; コマリら、*J. Bacteriol.*, 166:88-94, 1986; ジンら、*J. Bacteriol.* 169:4417-4425, 1987; コマリ、*Plant Science*, 60:223-229, 1989)。pTiBo542のヴィルレンス領域virB及びvirG遺伝子も公知であり、これらの文献に記載されている。pTiBo542のヴィルレンス領域virB及びvirG遺伝子は、pTiBo542を制限酵素KpnIで処理して得られる15.2 kbのDNA断片中に含まれるので、本発明においてもこの断片を用いることができる。なお、上記(a) (b) 及び(c)を含むアクセプターベクター自体は公知であり、例えば特開平4-222527号及びEP-A-0 504 869に記載されている。

一方、中間ベクターには、

- (i) 大腸菌中では機能するが、アグロバクテリウム属細菌中では機能しないプラスミド複製機能を有するDNA領域と、
- (ii) 上記アクセプターベクターの一部と相同であり、この部分を介してアグロバクテリウム属細菌中で相同組換えの可能なDNA領域と、
- (iii) 上記第2のT-DNAの少なくとも一部を構成するDNA領域とが含まれている。上記第2のT-DNAの一部は上記アクセプターベクターに含まれていてもよいが、第2のT-DNAの全域が中間ベクターに含まれている方が、所望のDNA断片を植物に導入できる効率が高いので好ましい。なお、植物に導入すべき所望のDNA断片は、中間ベクター上の第2のT-DNA内に制限酵素認識部位を利用して挿入されていることが好ましい。なお、上記(i)、(ii)及び(iii)を含む中間ベクター自体は公知であり、例えば特開平4-222527号及びEP-A-0 504 869に記載されている。

アグロバクテリウム属細菌中での上記アクセプターベクターと上記中間ベクターとの相同組換えは公知の方法（ヘレラーエステレラら、*EMBO J.* 2:987-995, 1983; ホーチら、*Science*, 223:496-498, 1984）により行うことができる。

上記第1のT-DNAは、上記第2のT-DNAを含むハイブリッドベクター上に存在していてもよいし、他のプラスミド上に存在していてもよい。後者の場合、ハイブリッドベクター及び他のベクターは単一のアグロバクテリウム属細菌中に含まれていてもよいし、別個のアグロバクテリウム属細菌中に含まれて（2菌系法）いてもよい。もっとも、選択した薬剤耐性植物細胞が、第2のT-DNAをも含んでいる確率は、第1のT-DNA及び第2のT-DNAが単一のハイブリッドベクター上に存在する場合の方が有意に高くなるので、第1のT-DNAもハイブリッドベクター上に存在することが好ましい。しかも、驚くべきことに、第1のT-DNAと第2のT-DNAとが単一のベクター上に存在する場合であっても、これらは独立的に植物に導入され、次世代において遺伝的に分離可能である。単一のベクター上に存在するT-DNAで植物を効率良く共形質転換する方法は本願発明者らが初めて開発したものであり、しかも、それが高頻度で遺伝的に独立的に植物に導入され得ることは本願発明者らが初めて見出したものである。

第1のT-DNAがハイブリッドベクター上に存在する場合、第1のT-DNAと第2のT-DNAとが遺伝的に独立的に植物に導入される可能性を高めるために、第1のT-DNAと第2のT-DNAとの距離が大きいことが好ましい。この目的のために、第1のT-DNAはアクセプターベクターに由来することが好ましい。また、この目的のために、第1のT-DNAと、上記第2のT-DNAは、上記ハイブリッドベクター上で、

(1) アグロバクテリウム属細菌中および大腸菌中で有効なプラスミド複製機能を有するDNA領域と、

(2) *Agrobacterium tumefaciens* のTiプラスミドpTiBo542のヴィルレンス領域のvirBおよびvirG遺伝子を含むDNA断片、
によって互いに隔てられていることが好ましい。

上記ハイブリッドベクターは、アグロバクテリウム属細菌に公知の方法で導入することができる。例えば、細菌の三系交雑法（ディッターら、Proc. Natl. Acad. sci. USA, 77:7347-7351, 1980）により行うことができる。

植物の形質転換に用いられるアグロバクテリウム属細菌としては、従来より、

この目的のために用いられているものを用いることができる。すなわち、T-DNAを含まないが、T-DNAの植物への転移に必要なウィルレンス領域を含むTiプラスミド又はRiプラスミドに由来するプラスミドを有するものを好ましく用いることができる。この例として、例えばAgrobacterium tumefaciens LBA4404（ホエケマら、nature, 303:179-180, 1983）を挙げることができるがこれに限定されるものではない。このようなアグロバクテリウム属細菌に上記ハイブリッドベクター又は第1のT-DNAを含むプラスミド（2菌系法の場合）を導入したものを形質転換に用いる。

次いで、ハイブリッドベクター又は第1のT-DNAを含むプラスミド（2菌系法の場合）を導入したアグロバクテリウム属細菌で植物を形質転換する。これは、植物の細胞、例えば植物の子葉断片を、アグロバクテリウム属細菌を含む液体培地中で培養することにより行うことができる。2菌系法の場合には、2種類の菌を含む液体培地中で培養すればよい。この形質転換方法自体は公知であり、例えば特開平4-222527号及びEP-A-0 504 869に記載されている。

形質転換処理した植物細胞のうち、第1のT-DNA中に含まれる薬剤耐性遺伝子によって薬剤耐性を付与された細胞を選択する。次いで、これらの細胞から、常法により植物体を再生させる。

このようにして得られた植物体は、かなりの確率で第2のT-DNAをも含む。下記実施例では、第1のT-DNAと第2のT-DNAとが単一のハイブリッドベクター上に存在する場合には、得られた植物体のうち約50%以上、2菌系法の場合でも約35%が第2のT-DNAをも有していた。

第1のT-DNAと第2のT-DNAを含む形質転換植物の多くのものにおいて、第1のT-DNAと第2のT-DNAとは独立に遺伝することが確認された。すなわち、下記実施例では、第1のT-DNAと第2のT-DNAとが単一のハイブリッドベクター上に存在している場合、第1のT-DNAと第2のT-DNAとを含む形質転換植物の79%が、2菌系法の場合71%において、第1のT-DNAと第2のT-DNAとが独立に遺伝することが確認された。従って、これらの形質転換植物を栽培すれば、次世代において、第2のT-DNAを含むが第1のT-DNAを含まない植物を得ることが可能である。

本発明はさらに、(1) 植物中で機能する薬剤耐性遺伝子を含む第1のT-DNAと、

(2) 制限酵素認識部位を有する第2のT-DNAとを含むハイブリッドベクターであって、該ハイブリッドベクターは、

少なくとも、

(a) アグロバクテリウム属細菌中および大腸菌中で有効なプラスミド複製機能を有するDNA領域と、

(b) *Agrobacterium tumefaciens* のTiプラスミドpTiBo542のヴィルレンス領域のvirBおよびvirG遺伝子を含むDNA領域と、

(c) 下記中間ベクターの一部と相同であり、この部分を介してアグロバクテリウム属細菌中で相同組換えの可能なDNA領域、

を含むアクセプターベクターと、

少なくとも、

(i) 大腸菌中では機能するが、アグロバクテリウム属細菌中では機能しないプラスミド複製機能を有するDNA領域と、

(ii) 上記アクセプターベクターの一部と相同であり、この部分を介してアグロバクテリウム属細菌中で相同組換えの可能なDNA領域と、

(iii) 上記第2のT-DNAの少なくとも一部を構成するDNA領域を含む中間ベクターとの、アグロバクテリウム属細菌中での相同組換えによって調製されたものであるハイブリッドベクターを提供する。このハイブリッドベクターは、上記した本発明の方法に用いるハイブリッドベクターとほぼ同じものであり、第2のT-DNA中に未だ所望のDNA断片が挿入されていない点が異なる。所望のDNA断片を第2のT-DNA中の制限酵素部位を利用して第2のT-DNAに挿入すれば、上記と同様に用いることができる。

実施例

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、下記実施例は例示のためにのみ記載するものであって、いかなる意味においても限定的に解釈してはならない。

実施例1 プラスミドの構築

本例での構築作業は、別に示す場合をのぞき、Sambrookら、Molecular Cloning, A laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York、1989に記載の方法により行った。

中間ベクターpSB21、pSB24の構築

pBR322をEcoRI およびClaIで切断し、T4 DNA polymerase で処理後、ClaIリンカー (5'-CATCGATG-3') を挿入し閉環した。トランスポゾンTn7 (DeGreve ら、Plasmid 6:235-248、1981)のスペクチノマイシン耐性遺伝子(SP 遺伝子)を含む2.6 kb DraI-EcoRI 断片を上記プラスミドのEcoRV-EcoRI の間にクローン化した。このプラスミドをEcoRI で開環後T4 DNA polymerase で処理し再環状化することによりEcoRI 部位を除去した。このプラスミドのSP遺伝子を含む2.4 kb ClaI 断片を、T4 DNAポリメラーゼ処理後pUC19 のSmaI部位に挿入しpTOK107 を作成した。pGA482 (An、Plant Physiol. 81:86-91、1986) の2.7 kb EcoRI-HindIII断片と、EcoRI およびHindIII で切断したpTOK107 を結合しpTOK170 を作成した。

pTOK170 をBamHI およびBglII で切断後閉環し、pYS138とした。pYS138をEcoRI およびAsp718I で切断し、T4 DNA polymerase 処理後、SalIリンカー (5'-GGTCGACC-3') を挿入し閉環しpYS151を作成した。pYS151をSalIで切断しこの部位に、pGA643 (Anら、Plant Molecular Biology Manual A3:1-19, Kluwer Academic, Dordrecht、1988) のT-DNAを含む4.7 kbのSalI断片を導入しpTOK235 を作成した。

pTOK235 をSacII 部位で切断し、T4 DNAポリメラーゼにより平滑末端化後、BglII リンカー (5'-CAGATCTG-3')、または、HindIII リンカー (5'-CAAGCTTG-3') を挿入し閉環し、得られたプラスミドをそれぞれpTOK245 とpTOK246 と命名した。

pTOK246 をHindIII およびEcoRI で切断し、T-DNA中の大部分のDNAを除去した後、ここに、pBI221 (Jefferson、Plant Molecular Biology Reporter 5:387-405、1987) の2.9 kb HindIII-EcoRI断片を挿入しpSB21 を作成した。pBI221の2.9 kb HindIII-EcoRI断には、植物細胞中で発現するベータグルクロニ

ダーゼ遺伝子 (G U S) がふくまれている。pSB21 は、①大腸菌およびアグロバクテリウム属細菌中で機能するスペクチノマイシン耐性遺伝子、②pGA482の2.7 kb EcoRI-HindIII断片に由来する、大腸菌中では機能するがアグロバクテリウム属細菌中では機能しないプラスミド複製機能を含む断片であって、同時にアクセプターベクターとの相同組換えを起こすことのできる断片、③T-DNAの左右ボーダー配列とこれには含まれたG U S遺伝子によって構成されるT-DNA領域を含む断片、によって構成される中間ベクターである。

同様にHindIII およびEcoRI で切断したpTOK246 に、同様にpIG221 (Ohtaら、Plant Cell Physiol. 31:805-813、1990) の3.1 kb HindIII-EcoRI断片を挿入しpSB24 を作成した。この断片には、イントロン配列を挿入したG U S遺伝子 (イントロンG U S) が含まれている。イントロンG U Sは、植物細胞中では効率良く発現するが、イントロンの作用により大腸菌ならびにアグロバクテリウム属細菌中ではまったく発現しない。pSB24 は、G U S遺伝子がイントロンG U S遺伝子になっている以外は、pSB21 と同様な中間ベクターである。

pSB22 の構築

ハイグロマイシン耐性遺伝子 (H P T、Gritz ら、Gene 25:179-188、1983) とpDH51 (Pietrazak et al. Nucleic Acids Res 14:5857-5868、1986) より構成されており、植物細胞中で機能するH P T遺伝子を含むpGL2を、SalIで切断しT4 DNAポリメラーゼで処理後閉環することにより、SalI認識部位を削除しpTOK234 とした。さらに、pTOK234 をKpnIで切断後同様の処理を行うことにより2 か所のKpnI認識部位を削除しpTOK244 とした。

pTOK244 をHindIII で切断後EcoRI で不完全分解し、1.9 kb 断片を単離してpTOK246 のHindIII とEcoRI 認識部位の間に導入することによりpSB22 を作成した。pSB22 は、G U S遺伝子がH P T遺伝子に置換されている点以外は、pSB21 と同様な中間ベクターである。

pYS169の構築

pGA482をHindIII およびEcoRI により切断し、T4 DNAポリメラーゼ処理後閉環することにより2.7 kb HindIII-EcoRI断片を削除しpYS169を作成した。pYS169には、T-DNAの左右ボーダー配列とこれには含まれた植物細胞中で機能するカ

ナマイシン耐性遺伝子 (NPT) によって構成される T-DNA が含まれている。なお、この NPT 遺伝子は、大腸菌およびアグロバクテリウム属細菌にもカナマイシン耐性を付与する能力がある。

pNB1の構築

pVCK101 (Knauf ら、Plasmid 8:45-54、1982) を EcoRI により切断し、T4 DNAポリメラーゼで処理後閉環することによって EcoRI 部位を削除した。さらに、BglIII で切断後閉環する操作を行ったところ、BglIII 部位が削除できたので、このプラスミドを pVCK101Q と命名した。pVCK101Q を HindIII と XhoI で切断し、HindIII-SalI で切断した pUC18 と結合し pTOK150 を作成した。pTOK150 を HindIII で切断し、T4 DNAポリメラーゼ処理後 EcoRI リンカー (5'-CCGAATTCGG-3') を挿入し閉環することにより、HindIII 部位を EcoRI 部位に変換し、pTOK239 とした。

pGA482 を HpaI で切断し、XhoI リンカー (5'-CCTCGAGG-3') を挿入し閉環して pTOK236 を作成した。pTOK236 を XbaI および EcoRI で分解し、2.6 kb 断片を単離した。pTOK239 を EcoRI および XbaI で切断し、2.7 kb 断片を除去し、pTOK236 の 2.7 kb XbaI-EcoRI 断片を挿入し閉環して pNB1 を作成した。pNB1 は、アクセプターベクターの 1 種であるが、T-DNA やヴィルレンス領域由来の DNA など は含んでいない。

pNB3とpNB4の構築

pNB1 を XhoI で切断し、pYS169 の NPT 遺伝子を含む T-DNA を含む 3.5 kb SalI 断片を挿入し閉環して pNB3 を作成した。pNB3 はアクセプターベクターの 1 種であり、NPT 遺伝子を含む T-DNA を含んでいる。

pNB1 を XhoI で切断し、pSB22 の HPT 遺伝子を含む T-DNA を含む 3.0 kb SalI 断片を挿入し閉環して pNB4 を作成した。pNB4 はアクセプターベクターの 1 種であり、HPT 遺伝子を含む T-DNA を含んでいる。

pSB1、pSB3、および、pSB4の構築

pNB1、pNB3、および、pNB4 を KpnI で切断し、pTiBo542 (American Type Culture Collection 受託番号 37349) のヴィルレンス領域の virB および virG 遺伝子を含む 15.2 kb KpnI 断片を挿入して閉環して 3 種のプラスミドを作成し、それぞれ、

pSB1、pSB3、pSB4とした。

pSB1は、アクセプターベクターの一種であり、これに、T-DNAを含む中間ベクターを組み込んだハイブリッドベクターを作成した場合、ヘルパープラスミドと組み合わせることにより、スーパーバイナリーベクターを構成することができる。

pSB3は選抜マーカー遺伝子としてNPT遺伝子を含むT-DNAを含んでいるアクセプターベクターであり、このT-DNAから、pTiBo542のヴィルレンス領域のvirBおよびvirG遺伝子を含む15.2 kb KpnI断片によって隔てられた部位に、中間ベクターを組み込むことのできる部位を有する。pSB3は、単独で、もしくは、中間ベクターを組み込んだハイブリッドベクターとして、ヘルパープラスミドと組み合わせることにより、スーパーバイナリーベクターを構成することができる。T-DNAを含む中間ベクターの組込によりハイブリッドベクターを作成した場合には、このハイブリッドベクターは、選抜マーカー遺伝子としてNPT遺伝子を含む第1のT-DNAと、これから、15.2 kb 以上隔てられた、第2のT-DNAの、2つのT-DNAを含むことが特徴である。

pSB4は選抜マーカー遺伝子としHPT遺伝子を含むT-DNAを含んでいるアクセプターベクターであり、このT-DNAから、pTiBo542のヴィルレンス領域のvirBおよびvirG遺伝子を含む15.2 kb KpnI断片によって隔てられた部位に、中間ベクターを組み込むことのできる部位を有する。pSB4は、単独で、もしくは、中間ベクターを組み込んだハイブリッドベクターとして、ヘルパープラスミドと組み合わせることにより、スーパーバイナリーベクターを構成することができる。T-DNAを含む中間ベクターの組込によりハイブリッドベクターを作成した場合には、このハイブリッドベクターは、選抜マーカー遺伝子としてNPT遺伝子を含む第1のT-DNAと、これから、15.2 kb 以上隔てられた、第2のT-DNAの、2つのT-DNAを含むことが特徴である。

pTOK253 の作成

pVCK102 (Knauf ら、Plasmid 8:45-54、1982) をSalIで切断し、pSB21 のT-DNAを含む4.1 kb SalI断片を挿入し閉環することによりpTOK253を作成した。pTOK253は、ヘルパープラスミドと組合わせてバイナリーベクターを構成す

ることができるプラスミドであり、そのT-DNAには植物細胞中で発現するGUS遺伝子が含まれ、薬剤耐性遺伝子は含まれていない。

pGA482-GUSの構築

pGA482をHindIII およびEcoRI で切断し、pBI221の2.9 kb HindIII-EcoRI断片を挿入しpGA482-GUSを作成した。pGA482は、ヘルパープラスミドと組合わせてバイナリーベクターを構成することができるプラスミドであり、そのT-DNAには植物細胞中で発現するカナマイシン耐性遺伝子(NPT)が含まれてる。また、pGA482-GUSは、ヘルパープラスミドと組合わせてバイナリーベクターを構成することができるプラスミドであり、そのT-DNAには植物細胞中で発現するGUS遺伝子とカナマイシン耐性遺伝子(NPT)が含まれてる。

実施例2 ハイブリッドベクター等を含むアグロバクテリウム属細菌の作成

本実施例では、アグロバクテリウム属細菌の培養はAB培地(Chilton ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71:3672-3676、1974)を用いて、28℃で行った。また、必要に応じ、テトラサイクリン(10 µg/ml)、カナマイシン(100 µg/ml)、ハイグロマイシン(50 µg/ml)、スペクチノマイシン(50 µg/ml)を添加した培地を用いた。

pNB1、pSB1、pSB3、および、pSB4を、Ditta ら(Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77:7347-7351、1980)の方法により、Agrobacterium tumefaciens 菌系LBA4404(Hoekema ら、Nature 303:179-180、1983)に導入した。LBA4404 は、T-DNAを除去したdisarmed のTiプラスミドpAL4404 を含む菌系である。pAL4404 は完全なヴィルレンス領域を保持しており、バイナリーベクターのヘルパープラスミドとして頻用されている。以下、プラスミドを導入したアグロバクテリウム属細菌は、例えば、LBA4404 (pNB1)のように、菌系名とこれに続く括弧内のプラスミド名によって記載することとする。

テトラサイクリン耐性菌であるLBA4404 (pNB1)に、Ditta らの方法により、スペクチノマイシン耐性遺伝子を有するpSB21を導入し、テトラサイクリン、スペクチノマイシン両薬剤に耐性の菌を選抜することにより、中間ベクターpSB21がpNB1に導入されたハイブリッドベクターを含むLBA4404 を得ることができた。このハイブリッドベクターをpNB121と命名した。

以下同様の操作により、下記表 1 に示すハイブリッドベクターを含むLBA4404を作成した。

表1

ハイブリッドベクターの作成

アクセプター ベクター名	アクセプター ベクターの 薬剤耐性	中間ベク ター名	中間ベク ターの 薬剤耐性	ハイブリッド ベクター名	ハイブリッド ベクターの 薬剤耐性
pNB1	TET	pSB21	SP	pNB121	TET SP
pNB1	TET	pSB24	SP	pNB124	TET SP
pSB1	TET	pSB21	SP	pSB121	TET SP
pSB1	TET	pSB24	SP	pSB124	TET SP
pSB3	TET NPT	pSB21	SP	pSB321	TET SP NPT
pSB3	TET NPT	pSB24	SP	pSB324	TET SP NPT
pSB4	TET HPT	pSB21	SP	pSB421	TET SP HPT
pSB4	TET HPT	pSB24	SP	pSB424	TET SP HPT

TET : テトラサイクリン耐性、

SP : スペクチノマイシン耐性

NPT : カナマイシン耐性、

HPT : ハイグロマイシン耐性

pGA482、pTOK253、および、pGA482-GUSを、Ditta らの方法によりLBA4404 に導入し、LBA4404(pGA482)、LBA4404(pTOK253)とLBA4404(pGA482-GUS) を作成した。

実施例3 タバコの形質転換と共形質転換の効率

タバコ（品種BY4）を温室で栽培し、葉を採取し、エチルアルコールおよび次亜塩素酸ナトリウムで表面殺菌した後、直径約6mm の葉片ディスクを調整した。この葉片と下記のうちの一種のアグロバクテリウム属細菌約 10^8 個の細胞とをLinsmaier and Skoog の無機塩類と30g/l のショ糖より成る液体培地2 ~3ml 中で48時間共存培養を行った。

LBA4404(pSB324)

LBA4404(pSB424)

LBA4404(pSB124) とLBA4404(pGA482) の等量混合菌

LBA4404(pNB124) とLBA4404(pGA482) の等量混合菌

LBA4404(pTOK253)とLBA4404(pGA482) の等量混合菌

LBA4404(pGA482-GUS)

LBA4404(pGA482)

その後、葉片を滅菌水で洗浄し細菌を洗い落とした後、Linsmaier and Skoog の無機塩類、インドール酢酸0.3 mg/l、6-(γ 、 γ)-ジメチルアリルアミノプリン10mg/ml、カナマイシン200mg/l、セフトキシム250mg/mlおよび寒天0.9%を含む培地に置床した。ただし、LBA4404(pSB424) を用いた場合には、カナマイシンに代えてハイグロマイシン50mg/lを添加した培地を用いた。培養1カ月後、発根したカナマイシン耐性もしくはハイグロマイシン耐性の薬剤耐性の植物体について、以下の方法によりGUSの発現を調査した後、温室で栽培した。

GUSの発現は、Jefferson ら (Plant Molecular Biology Reporter 5:387-405, 1987) の方法に準じ、小葉片 (2 × 2mm から10 × 10mm程度の間の大きさ) を植物から切除し、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルグルクロニド(X-Gluc) 500mg/l、50mM リン酸ナトリウム pH7.0、10mM β -メルカプトエタノール、10mM エチレンジアミン4酢酸ナトリウム、0.1%ガルコシンラウリルナトリウム、0.1% Triton X-100 の水溶液中に2 時間から一晩浸すことによって調査した。GUS

活性を示す場合には、葉片の特に切断面が濃青色を呈するが、G U S 活性を示さない場合にはそのような発色は認められない。

G U S 発現調査結果は下記表 2 に示すとおりである。

表 2

形質転換体の G U S 活性

形質転換に用いた アグロバクテリウム属細菌	供試薬剤 耐性個体	G U S 活性 を示す個体数	%
LBA4404(pSB324)	118	61	52
LBA4404(pSB424)	109	54	50
LBA4404(pSB124) と LBA4404(pGA482) の混合	100	35	35
LBA4404(pNB124) と LBA4404(pGA482) の混合	100	22	22
LBA4404(pTOK253) と LBA4404(pGA482) の混合	110	0	0
LBA4404(pGA482-GUS)	39	33	85
LBA4404(pGA482)	25	0	0

薬剤耐性を示すことは、選抜マーカー遺伝子を含む第1のT-DNAが当該植物に導入されていることを示しており、GUS活性を示すことはGUS遺伝子を含む第2のT-DNAが当該植物に導入されていることを示している。

LBA4404(pGA482)はGUS遺伝子を含んでいない菌であるので、得られた薬剤耐性植物はすべてGUS活性を示さなかった。

LBA4404(pGA482-GUS)は、薬剤耐性遺伝子とGUS遺伝子が接続されたT-DNAを含んでいるが、得られた薬剤耐性植物の85%からGUS活性が検出されたのみであった。これは、形質転換過程でGUS遺伝子が欠落する場合、もしくは、GUS遺伝子が導入されていても発現が不十分であるために検出されなかった場合があることを示している。

LBA4404(pTOK253)とLBA4404(pGA482)の混合菌を用いる方法は、従来技術(McKnightら、Plant Molecular Biology 8:439-445、1987)と同一の手法といえることができるが、この従来技術では、2種のT-DNAが導入された植物は全く検出することができなかった。これは、この従来技術の場合には、2種のT-DNAによる共形質転換個体が全く得られない場合もありうることを示しており、このことが、この方法が広く用いられていない原因のひとつであると考えられる。

LBA4404(pNB124)とLBA4404(pGA482)の混合菌を用いる方法は、pNB124というハイブリッドベクターを用いている点以外は、上記McKnightらの従来技術に類似した方法である。McKnightらの従来技術では、薬剤耐性の植物の内19%に第2のT-DNAが含まれていたが、LBA4404(pNB124)とLBA4404(pGA482)の混合菌ではその比は22%であり、よく似た結果が得られたといえる。

LBA4404(pSB124)とLBA4404(pGA482)の混合菌を用いる方法は、LBA4404(pSB124)が、pSB124というハイブリッドベクターを含む菌であり、スーパーバイナリーベクターを利用した手法であり、本発明で開発した方法(2菌系法)である。この方法では、薬剤耐性の植物のうち35%に第2のT-DNAが含まれることが確認され、LBA4404(pNB124)とLBA4404(pGA482)の混合菌の場合よりもはるかに共形質転換の効率が高いことが判明した。

なお、LBA4404(pSB124)とLBA4404(pGA482)の混合菌の場合と、LBA4404

(pNB124) と LBA4404(pGA482) の混合菌の場合の結果の比較については、下記のように統計学的分析を行うことができる。

両混合菌による共形質転換の確率が等しいという仮説を設定すると、

$$X^2 = 6.5 \times 6.5 \times (1/28.5 + 1/28.5 + 1/71.5 + 1/71.5) = 4.15$$

と計算され、これは自由度 1 をもつ。自由度 1 のとき X^2 が 4.15 よりも大きい確率は 5% 以下であるので、上記仮説は 5% 水準で棄却される。よって、両混合菌による共形質転換の確率には統計学的に有意な差がある。

LB4404(pSB324) もしくは LBA4404(pSB424) を用いる方法は、ハイブリッドベクター pSB324 もしくは pSB424 を含む菌を用いる方法であり、スーパーバイナリーベクターを利用した方法であり、本発明で開発した方法（1 菌系法）である。これらの方法では、薬剤耐性の植物のうち 50～52% に第 2 の T-DNA が含まれることが確認され、LBA4404(pNB124) と LBA4404(pGA482) の混合菌の場合や、LB4404(pSB124) と LBA4404(pGA482) の混合菌の場合よりもはるかに共形質転換の効率が低いことが判明した。

なお、LB4404(pSB324) もしくは LBA4404(pSB424) を用いる方法と、LBA4404(pNB124) と LBA4404(pGA482) の混合菌を用いる方法の結果の比較については、下記のように統計学的分析を行うことができる。

両方法による共形質転換の確率が等しいという仮説を設定すると、

$$X^2 = 19.9 \times 19.9 \times (1/95.1 + 1/41.9 + 1/131.9 + 1/58.1) = 23.43$$

と計算され、これは自由度 1 をもつ。自由度 1 のとき X^2 が 23.43 よりも大きい確率は 1% 以下であるので、上記仮説は 1% 水準で棄却される。よって、両方法による共形質転換の確率には 1% 水準で統計学的に有意な差がある。

また、LB4404(pSB324) もしくは LBA4404(pSB424) を用いる方法と、LBA4404(pSB124) と LBA4404(pGA482) の混合菌を用いる方法の結果の比較については、下記のように統計学的分析を行うことができる。

両方法による共形質転換の確率が等しいという仮説を設定すると、

$$X^2 = 10.9 \times 10.9 \times (1/104.1 + 1/45.9 + 1/122.9 + 1/54.1) = 6.89$$

と計算され、これは自由度 1 をもつ。自由度 1 のとき X^2 が 6.89 よりも大きい確率は 1% 以下であるので、上記仮説は 1% 水準で棄却される。よって、両方法による

共形質転換の確率には1%水準で統計学的に有意な差がある。

実施例 4 タバコに導入した T-DNA の遺伝

温室で栽培した形質転換植物より種子を採取した。一部の個体の種子について、エチルアルコールおよび次亜塩素酸ナトリウムで表面殺菌した後、Linsmaier and Skoog の無機塩類と30g/l のショ糖と寒天0.9%より成る培地に播種した。発芽した植物について、上記の手法により GUS 活性を調査するとともに、下記の手法により薬剤耐性を調査した。

小葉片 (3 × 3mm 程度) を切り取り、Linsmaier and Skoog の無機塩類、ショ糖30g/l、インドール酢酸3mg/l、ナフタレン酢酸3mg/l、カイネチン0.1mg/l、カナマイシン200mg/l、寒天0.9%より成る培地に置床した。なお、LBA4404 (pSB424) によって形質転換された植物の種子由来の植物については、カナマイシンに代えてハイグロマイシン50mg/ml を添加した培地を用いた。薬剤耐性植物の葉片はこの培地上でカルスを形成したが、薬剤感受性植物の葉片はカルスを形成せず枯死した。

LBA4404(pSB324)、LBA4404(pSB424)、または、LBA4404(pSB124) と LBA4404 (pGA482) の混合菌によって形質転換され、GUS 活性を示した植物の種子由来の植物については下記表 3 に示す結果が得られた。

表3 導入した薬剤耐性およびGUSについての次世代での分離

形質転換に用いた アグロバクテリウム属細菌	系統番号 (形質転換 当代の 個体番号)	植物数			
		GUS+ 耐性	GUS+ 感受性	GUS- 耐性	GUS- 感受性
LBA4404(pSB324)	324-6	45	0	12	4
LBA4404(pSB324)	324-8	7	0	52	0
LBA4404(pSB324)	324-14	49	0	0	11
LBA4404(pSB324)	324-23	37	17	2	0
LBA4404(pSB324)	324-25	49	0	0	11
LBA4404(pSB324)	324-28	35	9	12	3
LBA4404(pSB324)	324-32	0	55	0	4
LBA4404(pSB324)	324-41	16	1	40	3
LBA4404(pSB324)	324-49	42	9	0	4
LBA4404(pSB424)	424-1	32	6	14	6
LBA4404(pSB424)	424-4	30	15	10	4
LBA4404(pSB424)	424-10	50	9	0	1
LBA4404(pSB424)	424-14	55	2	0	0
LBA4404(pSB424)	424-15	45	11	0	1
LBA4404(pSB424)	424-20	48	5	0	1
LBA4404(pSB424)	424-30	39	18	1	1
LBA4404(pSB424)	424-32	55	3	0	0
LBA4404(pSB424)	424-38	39	14	0	6
LBA4404(pSB424)	424-41	26	6	17	5
LBA4404(pSB124) とLBA4404(pGA482) の混合	12482-6	0	0	53	4
LBA4404(pSB124) とLBA4404(pGA482) の混合	12482-9	44	0	13	3
LBA4404(pSB124) とLBA4404(pGA482) の混合	12482-33	21	22	1	16
LBA4404(pSB124) とLBA4404(pGA482) の混合	12482-40	32	0	0	15
LBA4404(pSB124) とLBA4404(pGA482) の混合	12482-53	24	23	0	9
LBA4404(pSB124) とLBA4404(pGA482) の混合	12482-63	38	6	50	0
LBA4404(pSB124) とLBA4404(pGA482) の混合	12482-64	30	5	35	4
LBA4404(pSB124) とLBA4404(pGA482) の混合	12482-66	34	14	13	3
LBA4404(pSB124) とLBA4404(pGA482) の混合	12482-77	84	5	1	1
LBA4404(pSB124) とLBA4404(pGA482) の混合	12482-101	52	0	28	1
LBA4404(pSB124) とLBA4404(pGA482) の混合	12482-108	13	2	72	7
LBA4404(pSB124) とLBA4404(pGA482) の混合	12482-113	57	16	17	5
LBA4404(pSB124) とLBA4404(pGA482) の混合	12482-137	80	18	2	0
LBA4404(pSB124) とLBA4404(pGA482) の混合	12482-139	76	20	0	0

GUS+ : GUS活性あり、
耐性 : 薬剤耐性あり、

GUS- : GUS活性なし、
感受性 : 薬剤耐性なし

以上の結果がしめすように、これらの植物には、薬剤耐性遺伝子を含むT-DNAやGUS遺伝子を含むT-DNAが複数因子以上導入されていた場合もあった。

LBA4404(pSB324)によって形質転換され、GUS活性を示した植物については、調査した9個体中5個体について、少なくとも1因子のGUS遺伝子を含むT-DNAが、薬剤耐性遺伝子を含むT-DNAとは独立に遺伝し、次世代において薬剤耐性遺伝子を含まず、GUS遺伝子を含む植物を得ることができた。

LBA4404(pSB424)によって形質転換され、GUS活性を示した植物については、調査した10個体中10個体について、少なくとも1因子のGUS遺伝子を含むT-DNAが、薬剤耐性遺伝子を含むT-DNAとは独立に遺伝し、次世代において薬剤耐性遺伝子を含まず、GUS遺伝子を含む植物を得ることができた。

LBA4404(pSB124)とLBA4404(pGA482)の混合菌によって形質転換され、GUS活性を示した植物については、調査した14個体中10個体について、少なくとも1因子のGUS遺伝子を含むT-DNAが、薬剤耐性遺伝子を含むT-DNAとは独立に遺伝し、次世代において薬剤耐性遺伝子を含まず、GUS遺伝子を含む植物を得ることができた。

なお、LBA4404(pGA482-GUS)によって形質転換され、GUS活性を示した植物の次世代には、薬剤耐性遺伝子を含まず、GUS遺伝子を含む植物はなかった。また、LBA4404(pGA482)によって形質転換された植物の次世代にはGUS活性を示す植物はなかった。

表3の系統番号324-28、424-4、424-30の形質転換体並びにその次世代の植物の葉より、Komariら(Theor. Appl. Genet. 77; 547-552, 1989)の方法に従いDNAを抽出し、制限酵素Hind IIIで処理後、Sambrookら(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edn. Cold Spring Harbor, NY)の方法に従いサザン分析を行った。その結果、薬剤耐性かつGUS活性を示す植物には両遺伝子が検出された。薬剤耐性を示し、GUS活性を示さない植物には薬剤耐性遺伝子のみが検出された。薬剤耐性を示さず、GUS活性を示す植物にはGUS遺伝子のみが検出された。また、薬剤耐性とGUS活性を共に示さな

い植物にはどちらの遺伝子も検出されなかった。

実施例 5 イネの形質転換と共形質転換効率

イネ（品種月の光）の完熟種子を70% エタノールに1分間、1%次亜塩素酸ナトリウムに30分間浸漬することによって消毒した後、2N6 固体培地（N6の無機塩類およびビタミン類（Chu C. C. Proc. Symp. Plant Tissue Culture, Science Press Peking, pp.43-50、1978）、カザミノ酸1g/l、2,4-D 2mg/l、ショ糖30g/l、ゲルライト2g/l）に置床した。約3週間培養後、形成された胚盤由来のカルスを2N6 固体培地に移植し、4～7日経過したカルスを胚盤カルスとして用いた。

AB培地上で3～10日間28℃で培養したLBA4404(pSB424)のコロニーを白金耳でかきとり、修正AA培地（AA主要無機塩類、AAアミノ酸およびビタミン類（Toriyamaら、Plant Science 41:179-183、1985）、MS微量塩類（Murashigeら、Physiol. Plant. 15:473-497、1962）、カザミノ酸0.5g/l、ショ糖0.2M、グルコース0.2M、アセトシリゴン100 μM、pH5.2）に懸濁し、菌濃度を 1×10^9 細胞/mlに調整し接種に用いた。

胚盤カルスを滅菌水で洗浄後、上述の菌液に3～10分間浸漬した。浸漬処理後、アセトシリゴン、グルコースとショ糖を、修正AA培地と同濃度で含む2N6 固体培地に移植し、25℃、暗黒下で3日間培養した。その後、胚盤カルスをセフトキシム250mg/lを含む滅菌水で洗浄した。

カルスをハイグロマイシン50mg/lとセフトキシム250mg/lを含む2N6 固体培地に移し、3週間培養してハイグロマイシン耐性のカルスを選抜した。得られた耐性カルスを、さらに、ハイグロマイシン100 mg/lとセフトキシム250mg/lを含むN6-7培地（N6無機塩類、N6ビタミン類、カザミノ酸2g/l、2,4-D 1 mg/l、6BA 0.5mg/l、ソルビトール30g/l、ショ糖20g/l、ゲルライト2g/l）で2～3週間培養した。この培地で増殖したカルスをハイグロマイシン50mg/lとセフトキシム250mg/lを含む個体再生用培地N6S3（1/2 N6主要無機塩類、N6微量塩類、N6ビタミン類（Chu 1978）、AAアミノ酸（Toriyamaら、1985）、カザミノ酸1g/l、ナフタレン酢酸0.2mg/l、カイネチン1.0mg/l、ゲルライト3g/l）に移し、ハイグロマイシン耐性植物を再生させた。

ハイグロマイシン耐性植物について、上記の手法によりGUS活性を検定した後、閉鎖系温室で栽培した。

ハイグロマイシン耐性植物は、下記表4に示すように供試したカルスの12.3～44.0%から得られた。また、下記表5に示すように、ハイグロマイシン耐性植物のうち42～51%がGUS活性を示した。

表4 共形質転換によるハイグロマイシン
耐性個体の選抜効率

カルス数			
供試 カルス (a)	耐性 カルス	再分化 カルス (b)	選抜効率 (b/a : %)
227	40	28	12.3
398	90	75	18.8
220	116	97	44.0
324	77	72	22.2

表5 ハイグロマイシン耐性個体に
おけるGUS活性

供試薬剤 耐性個体数	GUS活性を 示す個体数	%
97	41	42
176	82	47
126	60	48
150	76	51

ハイグロマイシン耐性かつGUS活性を示した個体の葉よりKomariら (Theor. Appl. Genet. 77; 547-552, 1989)の方法に従いDNAを抽出し、制限酵素Hind IIIで処理後、Sambrookら (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edn. Cold Spring Harbor, NY)の方法に従いサザン分析を行った。その結果、各個体ともハイグロマイシン耐性遺伝子、GUS遺伝子の存在が確認された (表6)。

表6 形質転換体のサザン分析結果および次世代における
導入遺伝子の分離

形質 転換 体の 系統	サザン分析		次世代			
	導入遺伝子		植物数			
	コピー数		G U S +	G U S +	G U S -	G U S -
	H P T *	G U S	耐性	感受性	耐性	感受性
1	1	1	4 4	1 1	1 2	3
2	1 - 2	2 - 3	4 1	2 2	2	5
3	2 - 3	2 - 3	6 7	1	2	0
4	4	2	6 8	2	6	0
5	1	2	5 1	1 4	0	5
6	2	1	5 2	0	0	1 8
7	1	1	5 1	0	0	1 9
8	1	2	3 4	1 1	1 7	7
9	2	3 - 4	1 4	4 3	4	9
1 0	2	1	5 2	0	1 4	3
1 1	1	2 - 3	4 6	1 7	0	7
1 2	2	2	5 1	0	0	1 9

* H P T : ハイグロマイシン耐性遺伝子

実施例6 イネに導入したT-DNAの遺伝

温室で栽培した形質転換植物より種子を採取した。一部の個体の種子について、エチルアルコール及び次亜塩素酸ナトリウムで表面殺菌した後、N 6 ホルモンフリーの培地に播種した。発芽発根した種子について、上記の手法によりG U S活性を調査すると共に、下記の手法によりハイグロマイシン耐性を調査した。

幼根を5～10 mmの長さで切り取り、ハイグロマイシン50 mg / lを含む

2 N 6 培地に置床した。ハイグロマイシン耐性の個体の幼根断片はカルスを形成したが、ハイグロマイシンに感受性の個体の根はカルスを形成せず座死した。

LBA4404(pSB424) で形質転換され、G U S 活性及びハイグロマイシン耐性を示した植物の種子由来の次世代植物について表 6 に示す結果が得られた。

以上の結果が示すように、これらの植物には、タバコにおけるのと同様に、薬剤耐性遺伝子を含む T-DNA や G U S 遺伝子を含む T-DNA が複数因子以上導入されていた場合もあった。また、遺伝因子数はサザン分析により得られた導入遺伝子のコピー数と一致するものと、少ないものが認められた。遺伝因子数が、サザン分析によるコピー数より少ないものについては、複数の遺伝子が同一遺伝子座に導入されたことを示すものと考えられる。

LBA4404(pSB424) によって形質転換され、G U S 活性及びハイグロマイシン耐性を示した植物については、調査した 12 個体中 8 個体について、少なくとも 1 因子の G U S 遺伝子を含む T-DNA が、薬剤耐性遺伝子を含む T-DNA とは独立に遺伝し、次世代において薬剤耐性遺伝子を含まず、G U S 遺伝子を含む植物を得ることができた。

形質転換体の次世代植物における導入遺伝子の存在を確認するため、表 6 の各系統の個体の次世代の植物を各表現型（G U S + かつハイグロマイシン耐性、G U S + かつハイグロマイシン感受性、G U S - かつハイグロマイシン耐性、G U S - かつハイグロマイシン感受性）に分けてサザン分析を行った。その結果、ハイグロマイシン耐性遺伝子及び G U S 遺伝子が表現型と一致するかたちで存在していることが確認された。

産業上の利用可能性

上述のように、本発明によれば、高い効率で所望の遺伝子が導入された再生した形質転換植物を作成し、次世代において該所望の遺伝子を含むが、選択マーカーとして用いる薬剤耐性遺伝子を含まない形質転換植物を得ることが可能になるので、本発明は、所望の形質を有する有用な新規植物を作出する上で有用であり、農業上有用である。

請求の範囲

1. 下記第1のT-DNA(1)と下記第2のT-DNA(2)によって植物細胞を共形質転換し、薬剤耐性となった細胞を選択することを特徴とする、アグロバクテリウム属細菌を介する植物の形質転換方法。

(1) 植物中で機能する、上記薬剤耐性を付与する薬剤耐性遺伝子を含む第1のT-DNA。

(2) 下記ハイブリッドベクター中に含まれ、植物に導入すべき所望のDNA断片が内部に挿入された第2のT-DNA。

上記ハイブリッドベクターは、下記アクセプターベクターと下記中間ベクターとの、アグロバクテリウム属細菌中での相同組換えによって調製されたものである。

上記アクセプターベクターは、少なくとも、

(a) アグロバクテリウム属細菌中および大腸菌中で有効なプラスミド複製機能を有するDNA領域と、

(b) *Agrobacterium tumefaciens* のTiプラスミドpTiBo542のヴィルレンス領域のvirBおよびvirG遺伝子を含むDNA領域と、

(c) 下記中間ベクターの一部と相同であり、この部分を介してアグロバクテリウム属細菌中で相同組換えの可能なDNA領域を含むものである。

上記中間ベクターは、少なくとも、

(i) 大腸菌中では機能するが、アグロバクテリウム属細菌中では機能しないプラスミド複製機能を有するDNA領域と、

(ii) 上記アクセプターベクターの一部と相同であり、この部分を介してアグロバクテリウム属細菌中で相同組換えの可能なDNA領域と、

(iii) 上記第2のT-DNAの少なくとも一部を構成するDNA領域を含むものである。

2. 上記第1のT-DNAと上記第2のT-DNAとは単一の上記ハイブリッドベクター中に含まれる請求項1記載の方法。

3. 上記第1のT-DNAは、上記アクセプターベクター中に含まれる請求項2

記載の方法。

4. 上記第1のT-DNAと、上記第2のT-DNAは、上記ハイブリッドベクター上で、

(1) アグロバクテリウム属細菌中および大腸菌中で有効なプラスミド複製機能を有するDNA領域と、

(2) *Agrobacterium tumefaciens* のTiプラスミドpTiBo542のヴィルレンス領域のvirBおよびvirG遺伝子を含むDNA断片、

によって互いに隔てられている請求項1ないし3のいずれか1項に記載の方法。

5. 上記第1のT-DNAと、上記ハイブリッドベクターは異なるアグロバクテリウム属細菌に含まれており、この2種のアグロバクテリウム属細菌を混合して上記植物を形質転換することを特徴とする請求項1記載の方法。

6. 上記pTiBo542のヴィルレンス領域のvirBおよびvirG遺伝子を含むDNA領域は、pTiBo542の15.2 kb KpnI断片である請求項1ないし5のいずれか1項に記載の方法。

7. 植物に導入すべき上記所望のDNA断片は、上記中間ベクター中の、上記第2のT-DNAの少なくとも一部を構成するDNA領域中に制限酵素認識部位を利用して挿入されている請求項1ないし6のいずれか1項に記載の方法。

8. 上記中間ベクターは、上記第2のT-DNAの全域を含む請求項1ないし7のいずれか1項に記載の方法。

9. T-DNAを含まないが、T-DNAの植物への転移に必要なヴィルレンス領域を含むTiプラスミド又はRiプラスミドに由来するプラスミドとともに上記ハイブリッドベクターを含むアグロバクテリウム属細菌を上記植物に感染させることを含む請求項1ないし8のいずれか1項に記載の方法。

10. 上記薬剤耐性遺伝子は、カナマイシン耐性遺伝子またはハイグロマイシン耐性遺伝子である請求項1ないし8のいずれか1項に記載の方法。

11. 上記第1のT-DNAはプラスミド上にあり、T-DNAを含まないがT-DNAの植物への転移に必要なヴィルレンス領域を含むことを特徴とするTiまたはRiプラスミドに由来する第2のプラスミドとともに上記第1のT-DNAを含むアグロバクテリウム属細菌を感染させることを含む請求項5記載の方法。

12. 上記アクセプターベクターはpSB3またはpSB4である請求項1ないし4のいずれか1項に記載の方法。

13. 上記アクセプターベクターはpSB1またはpTOK162である請求項5又は10に記載の方法。

14. 上記中間ベクターは、pSB21、pSB22、pSB24、pTOK170、pYS151、pTOK235、pTOK245、pTOK246又はこれらの誘導体である請求項1ないし12のいずれか1項記載の方法。

15. 請求項1ないし13のいずれか1項に記載の方法により形質転換した植物を栽培し、次世代において、植物に導入すべき上記所望のDNA断片を有するが上記薬剤耐性遺伝子を有さない植物を得る、形質転換植物の取得方法。

16. (1) 植物中で機能する薬剤耐性遺伝子を含む第1のT-DNAと、
(2) 制限酵素認識部位を有する第2のT-DNAとを含むハイブリッドベクター。

該ハイブリッドベクターは、下記アクセプターベクターと下記中間ベクターとの、アグロバクテリウム属細菌中での相同組換えによって調製されたものである。

上記アクセプターベクターは、少なくとも、

(a) アグロバクテリウム属細菌中および大腸菌中で有効なプラスミド複製機能を有するDNA領域と、

(b) *Agrobacterium tumefaciens* のTiプラスミドpTiBo542のヴィルレンス領域のvirBおよびvirG遺伝子を含むDNA領域と、

(c) 下記中間ベクターの一部と相同であり、この部分を介してアグロバクテリウム属細菌中で相同組換えの可能なDNA領域を含むものである。

上記中間ベクターは、少なくとも、

(i) 大腸菌中では機能するが、アグロバクテリウム属細菌中では機能しないプラスミド複製機能を有するDNA領域と、

(ii) 上記アクセプターベクターの一部と相同であり、この部分を介してアグロバクテリウム属細菌中で相同組換えの可能なDNA領域と、

(iii) 上記第2のT-DNAの少なくとも一部を構成するDNA領域を含むものである。

17. 上記第1のT-DNAは、上記アクセプターベクター中に含まれる請求項15記載のハイブリッドベクター。

18. 上記第1のT-DNAと、上記第2のT-DNAは、上記ハイブリッドベクター上で、

(1) アグロバクテリウム属細菌中および大腸菌中で有効なプラスミド複製機能を有するDNA領域と、

(2) *Agrobacterium tumefaciens* のTiプラスミドpTiBo542のヴィルレンス領域のvirBおよびvirG遺伝子を含むDNA断片、

によって互いに隔てられている請求項15又は16記載のハイブリッドベクター。

19. 上記pTiBo542のヴィルレンス領域のvirBおよびvirG遺伝子を含むDNA領域は、pTiBo542の15.2 kb KpnI断片である請求項15ないし17のいずれか1項に記載のハイブリッドベクター。

20. 上記薬剤耐性遺伝子は、カナマイシン耐性遺伝子またはハイグロマイシン耐性遺伝子である請求項15ないし18のいずれか1項に記載のハイブリッドベクター。

21. 上記アクセプターベクターはpSB3またはpSB4である請求項15ないし19のいずれか1項に記載のハイブリッドベクター。

22. 上記中間ベクターは、pSB21、pSB22、pSB24、pTOK170、pYS151、pTOK235、pTOK245、pTOK246又はこれらの誘導体である請求項15ないし20のいずれか1項に記載のハイブリッドベクター。

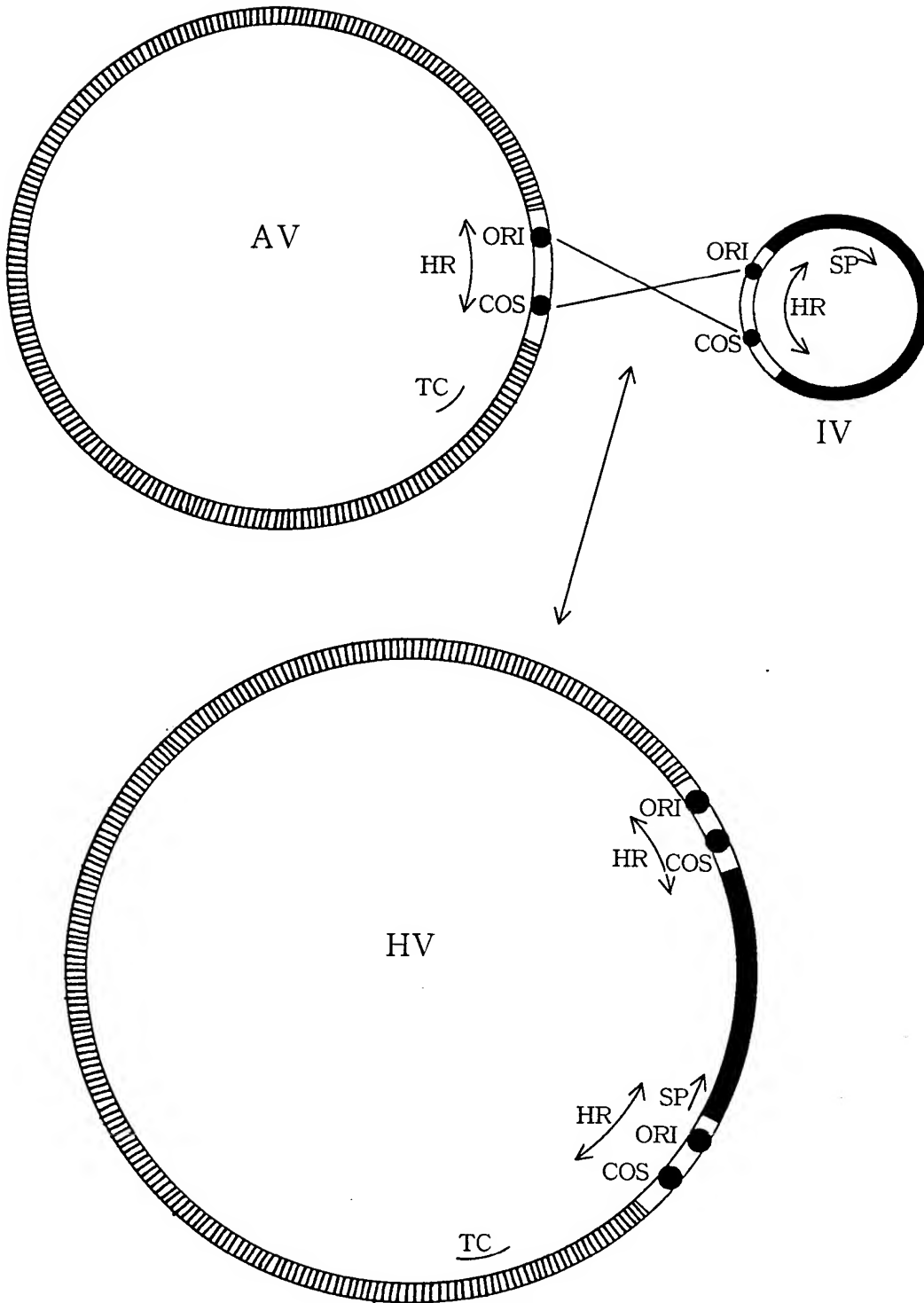


図 1

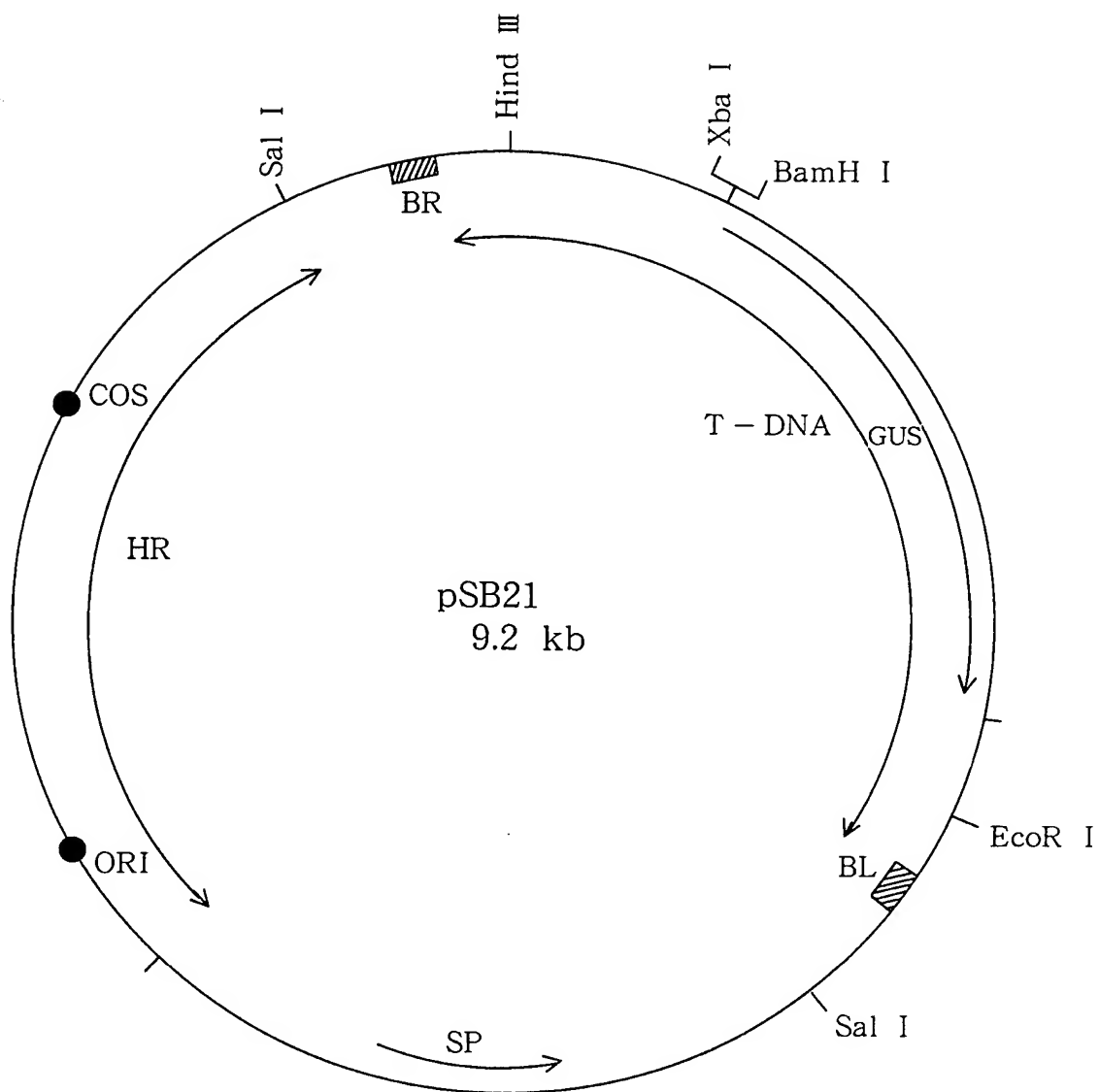


図 2

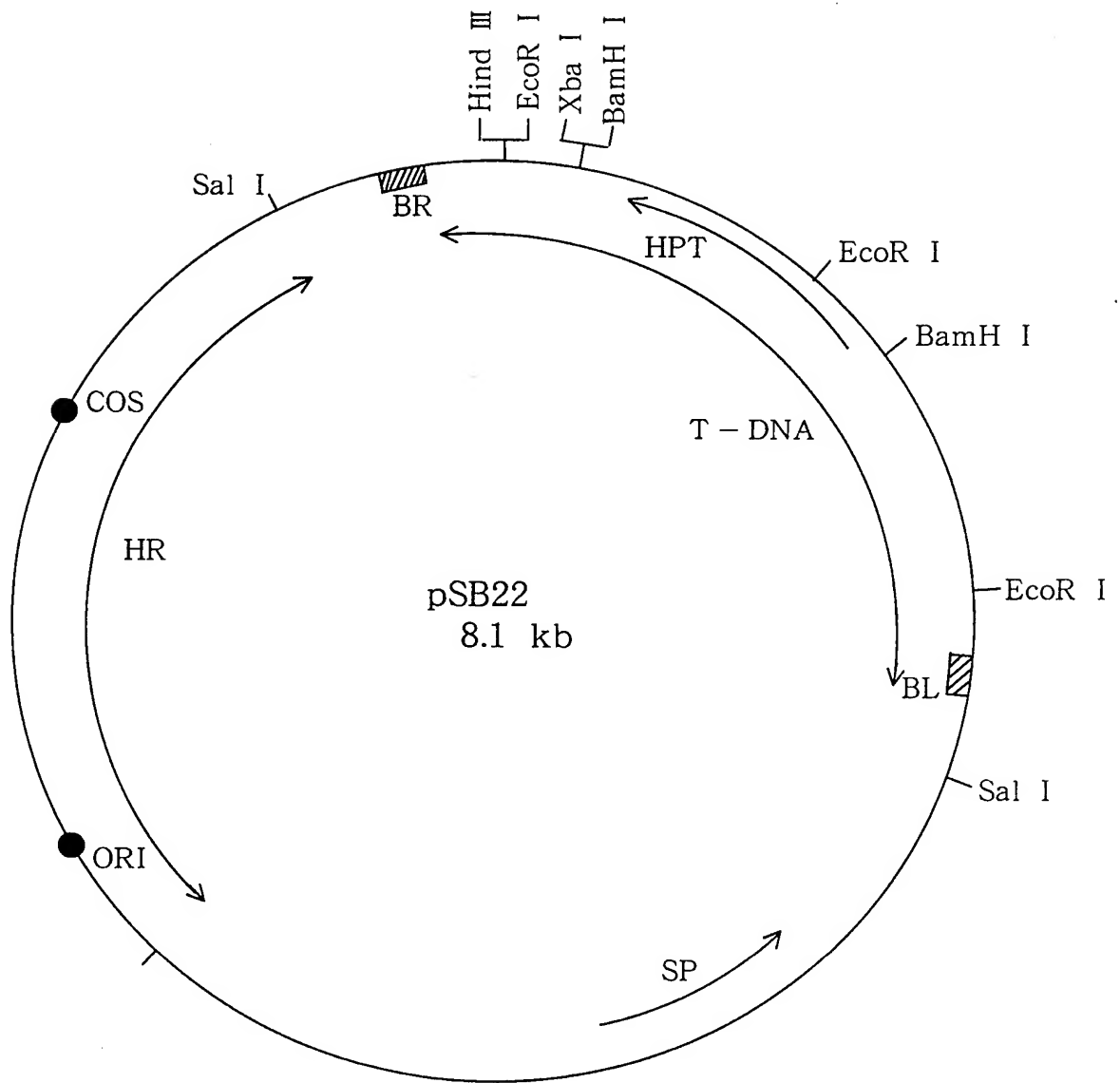


図 3

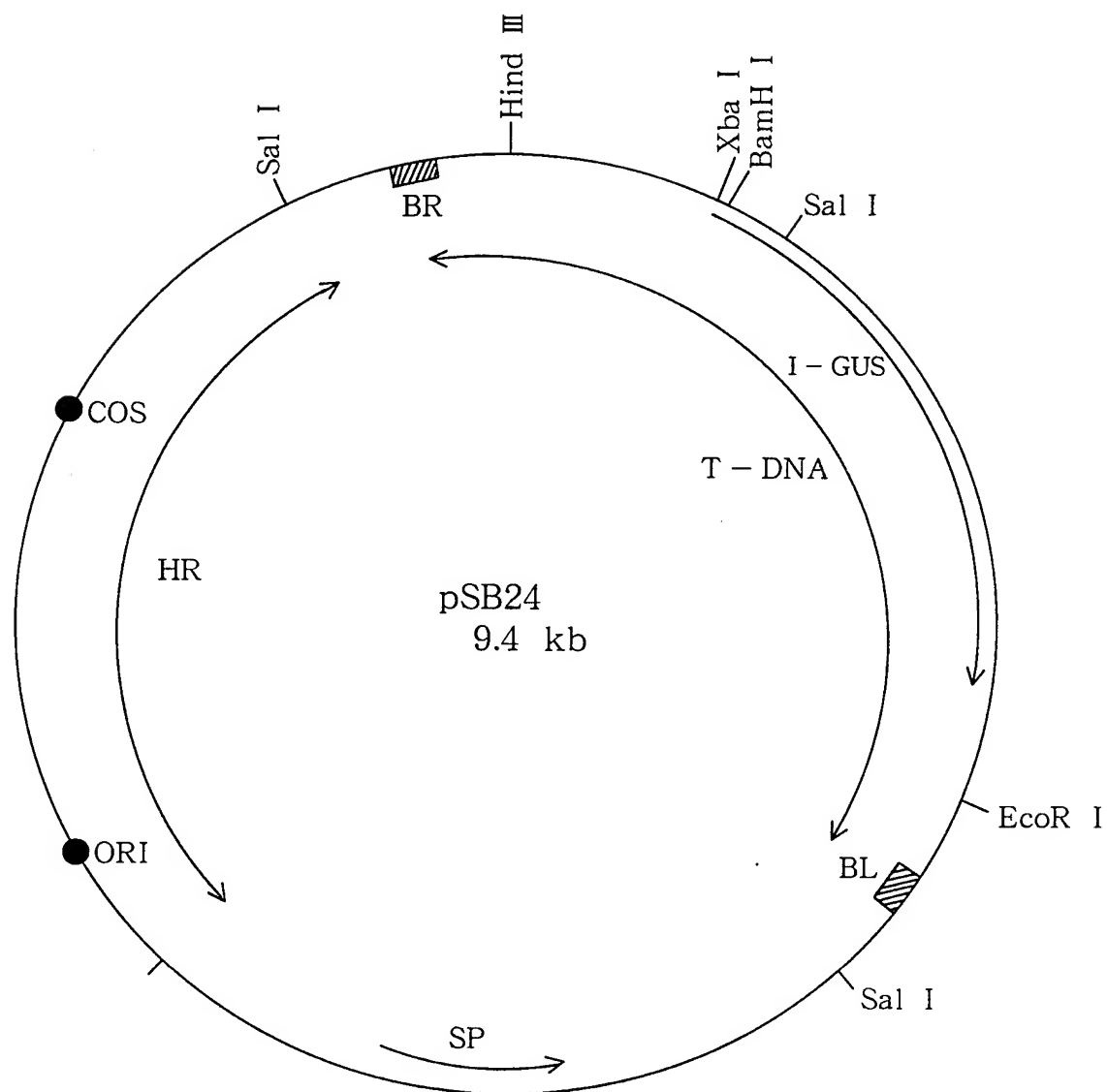


図 4

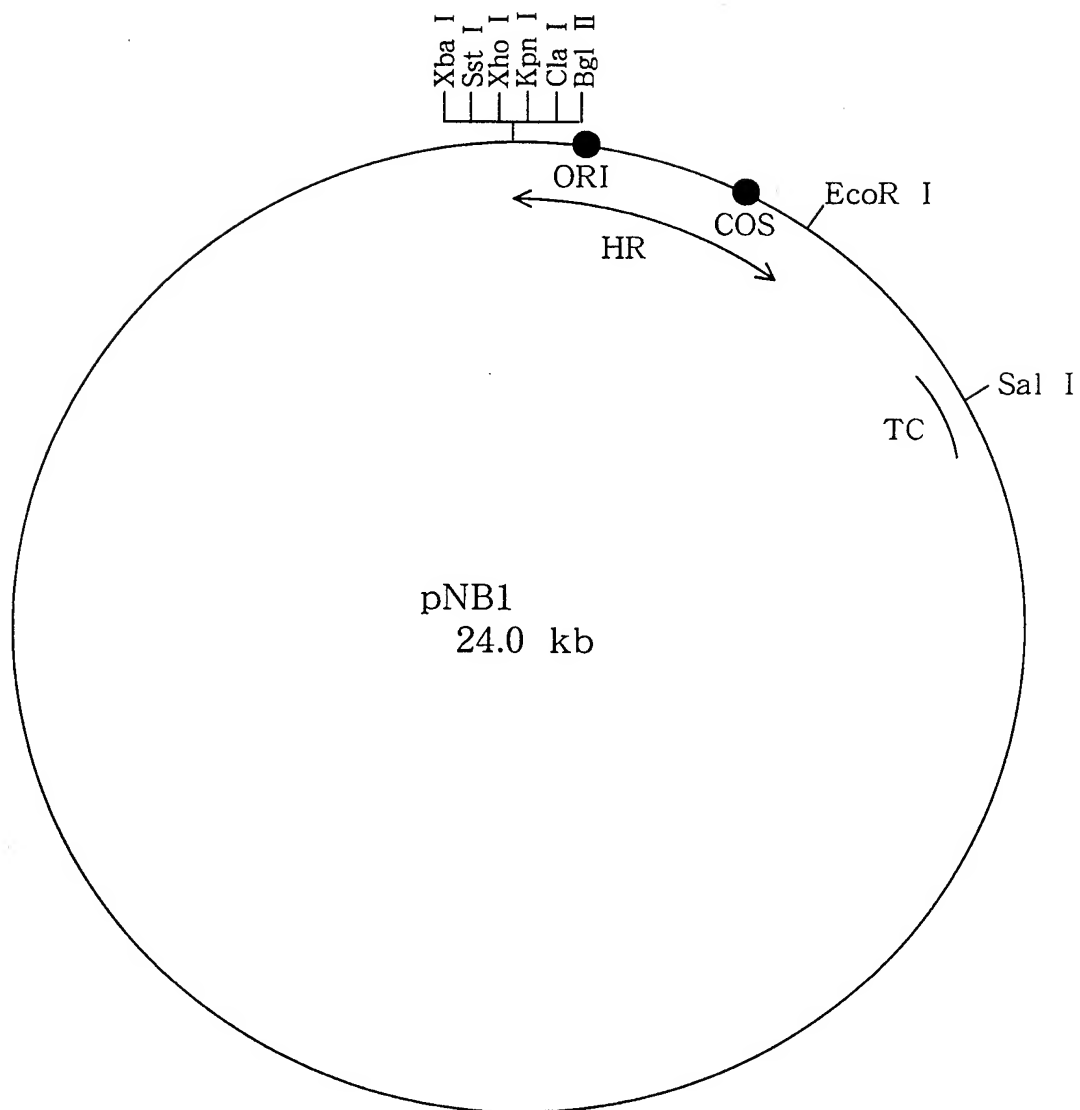


図 5

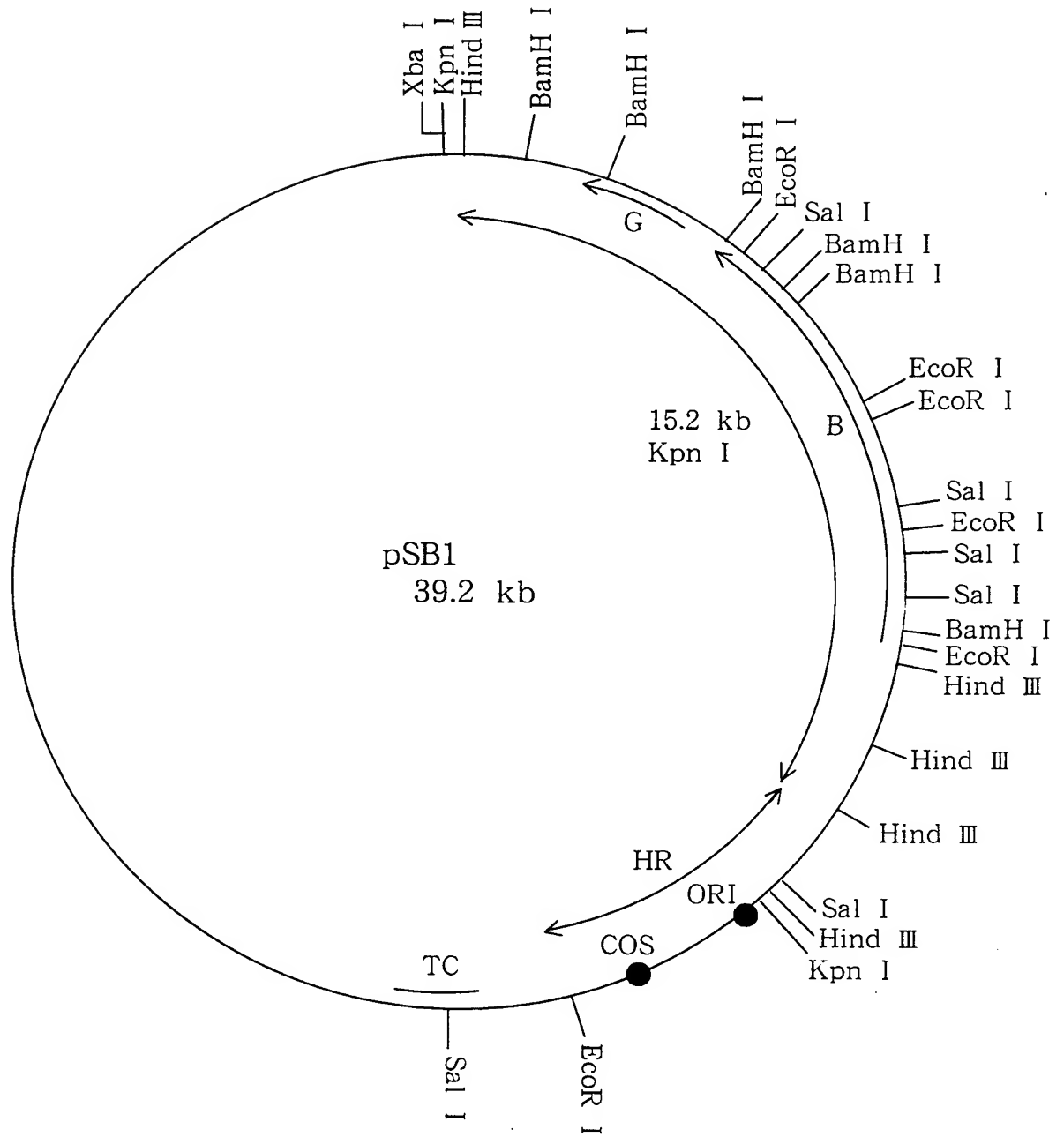
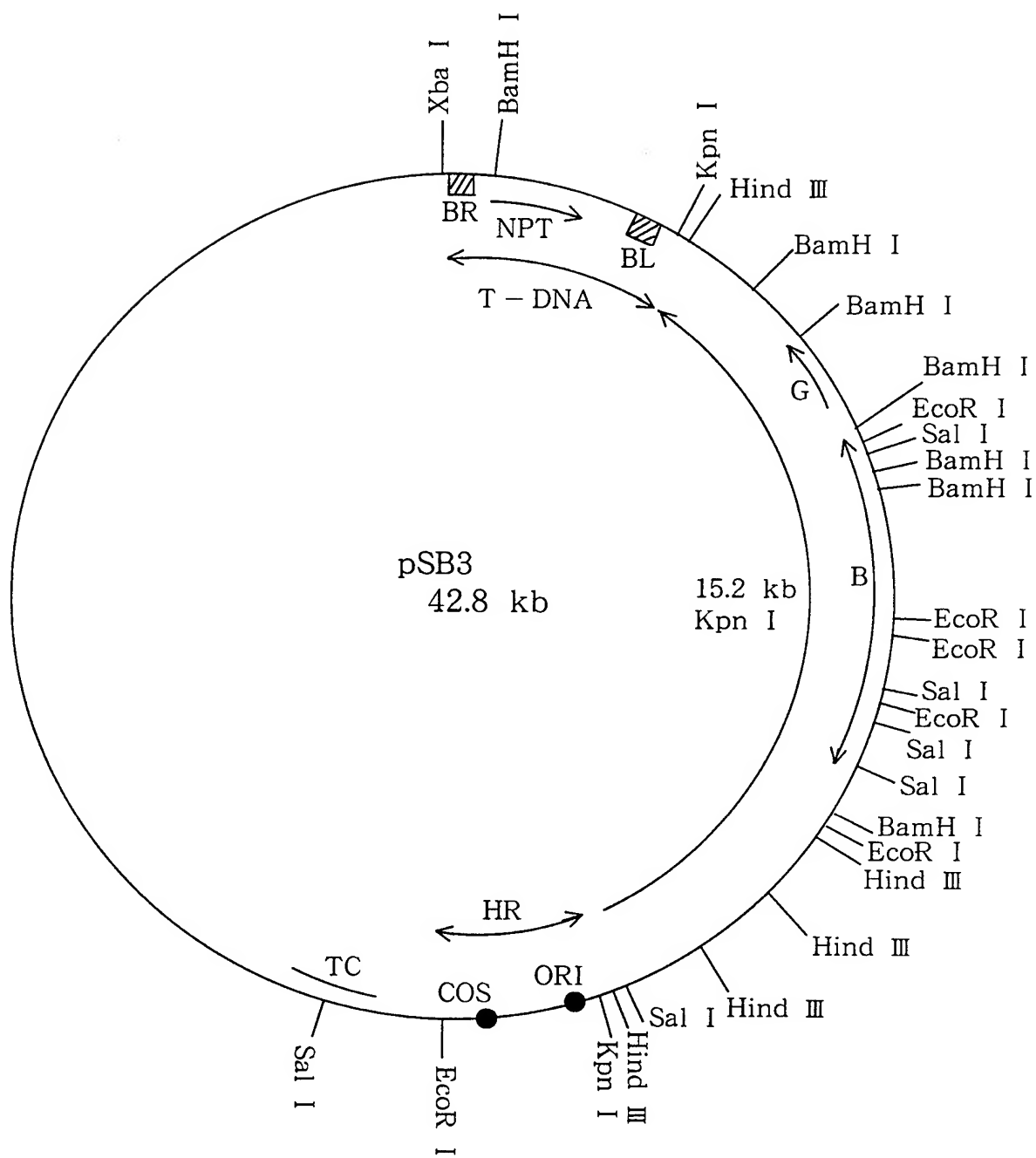
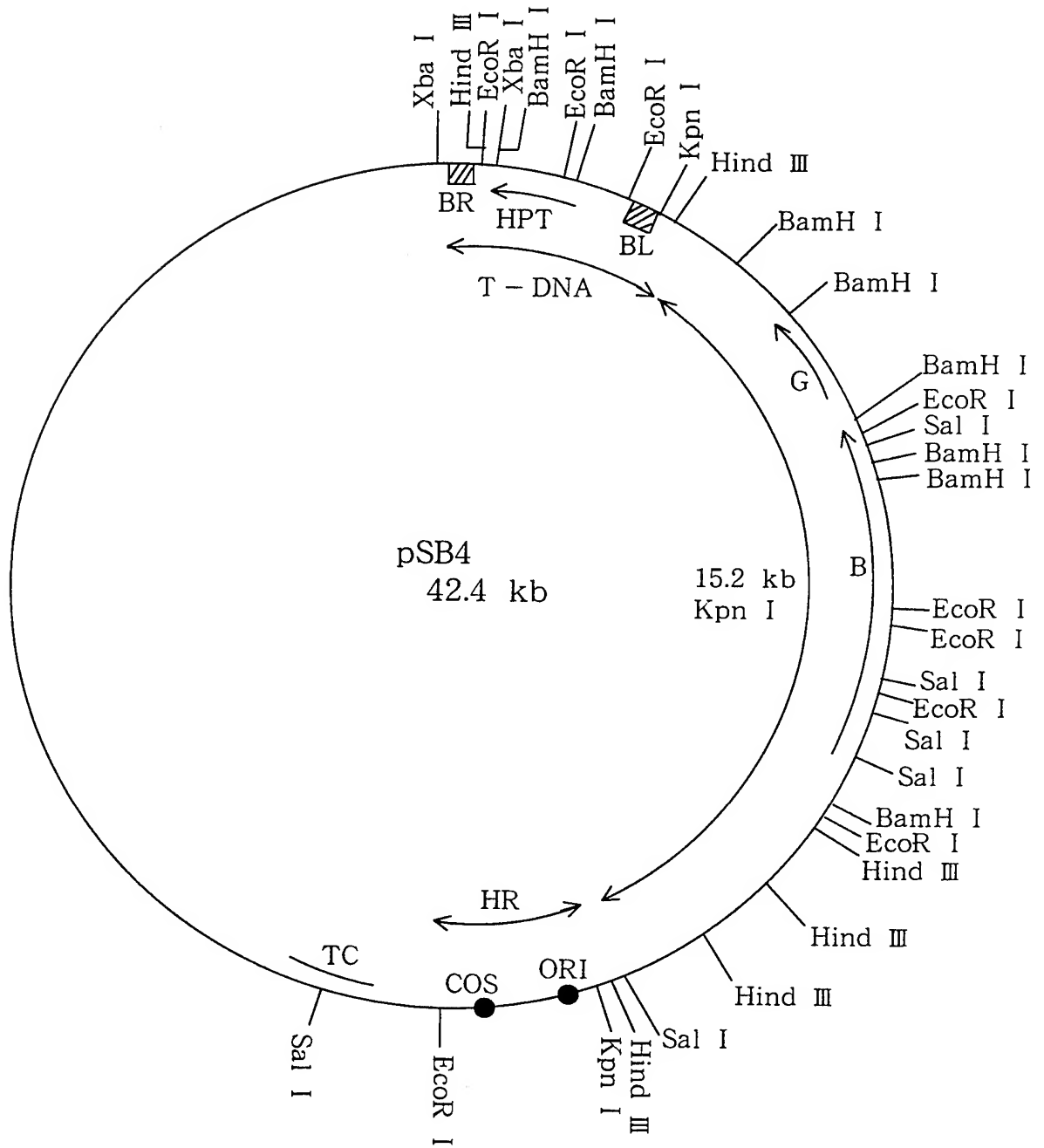


图 6



7



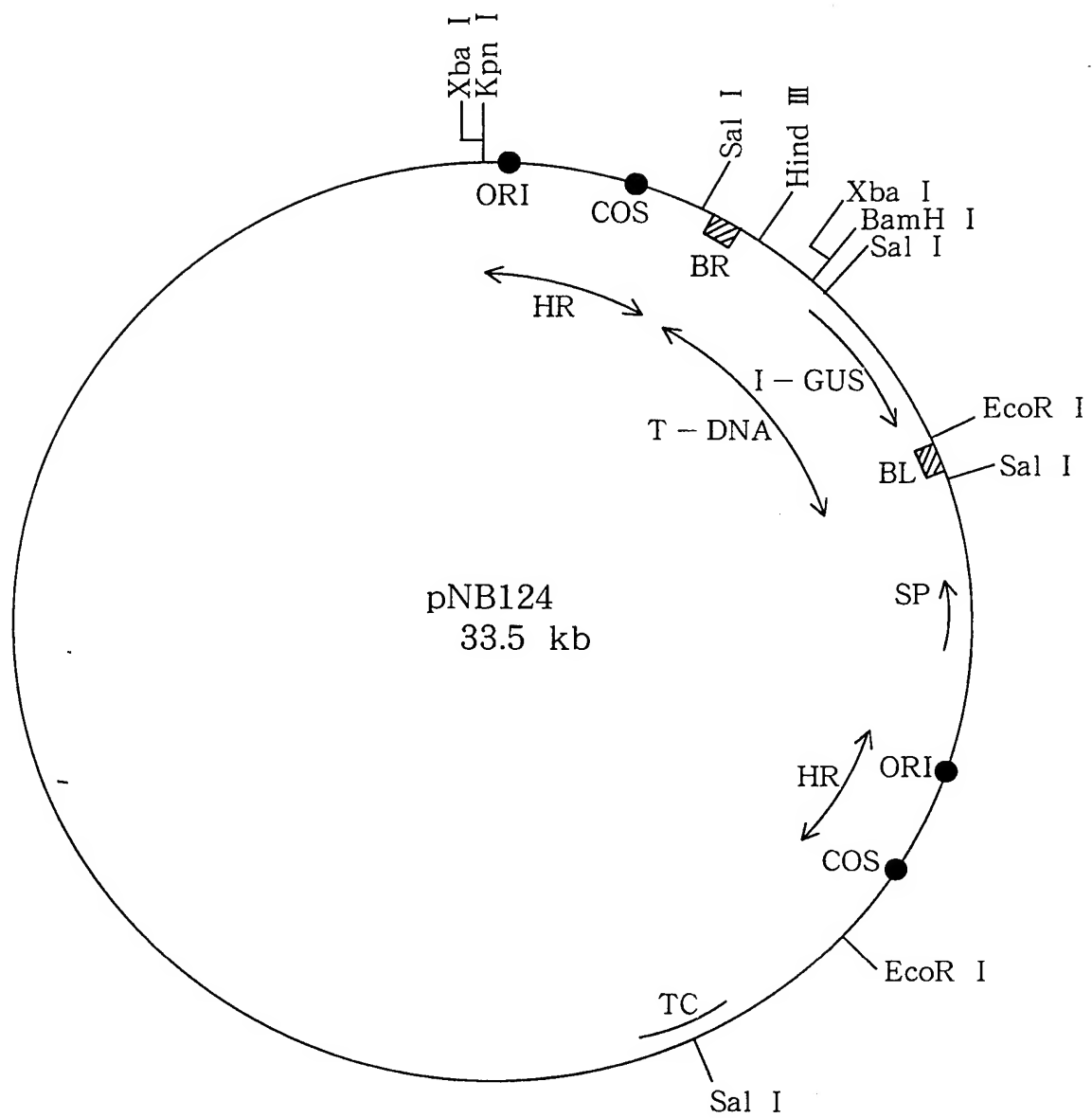


図 9

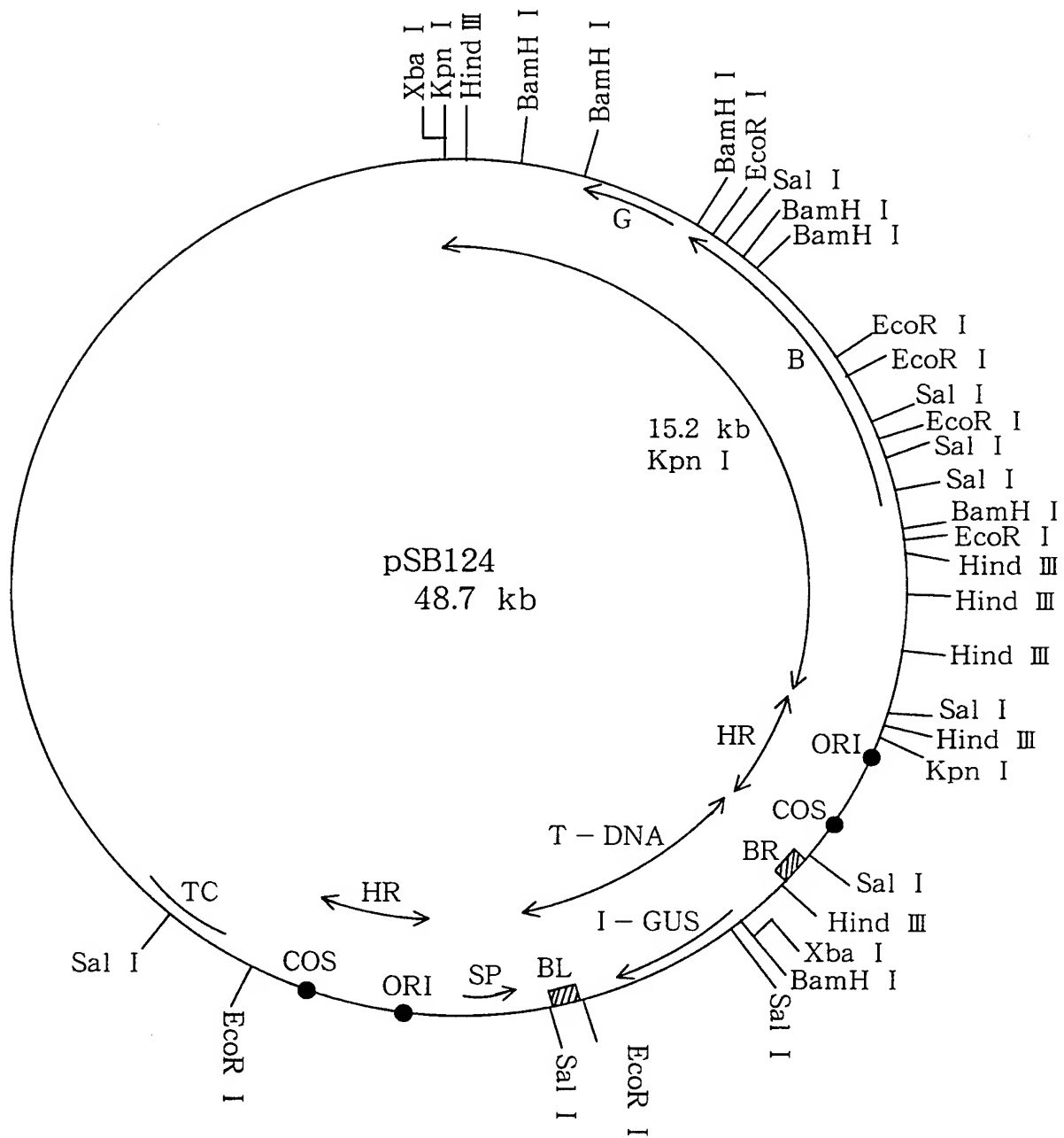
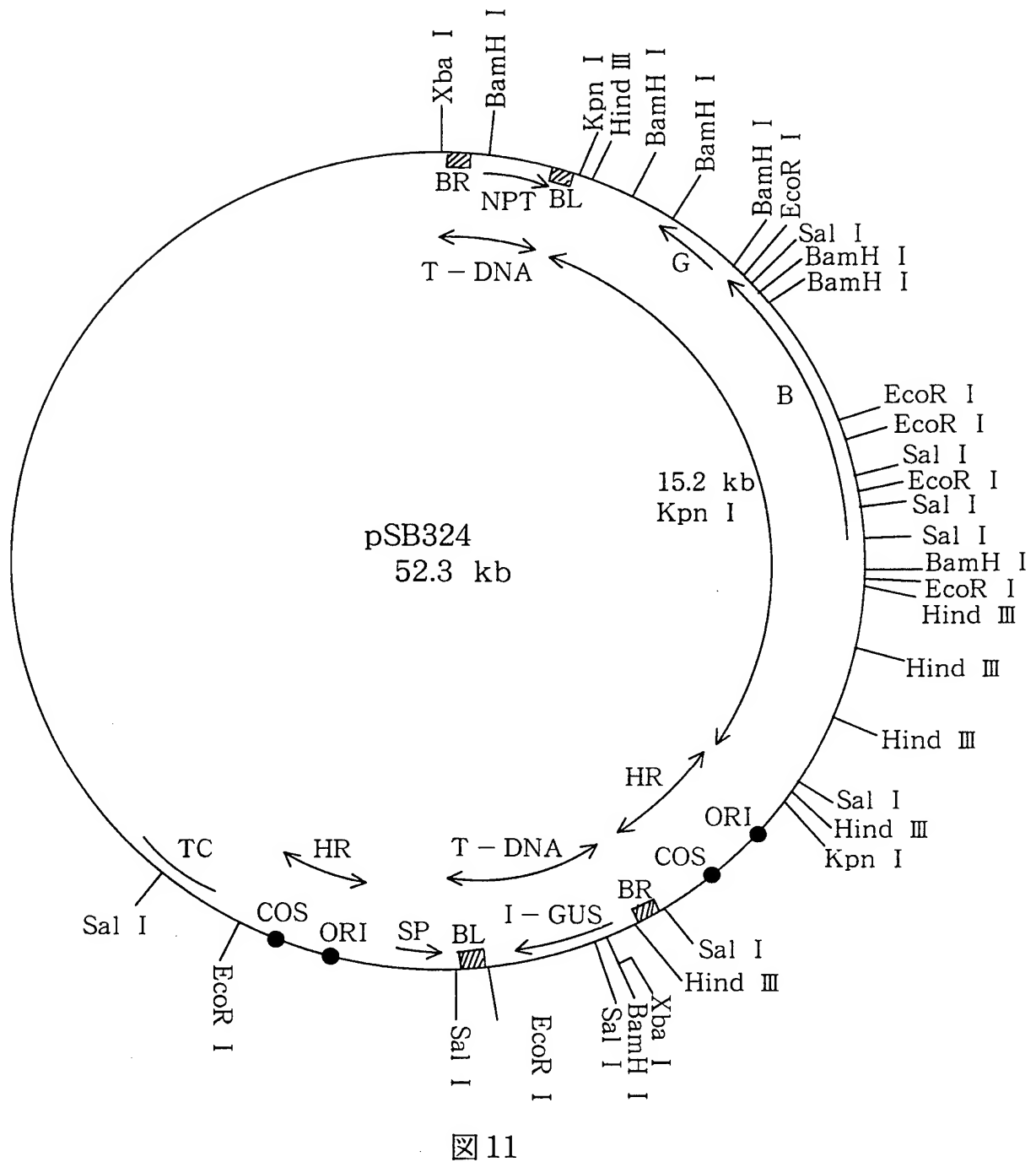
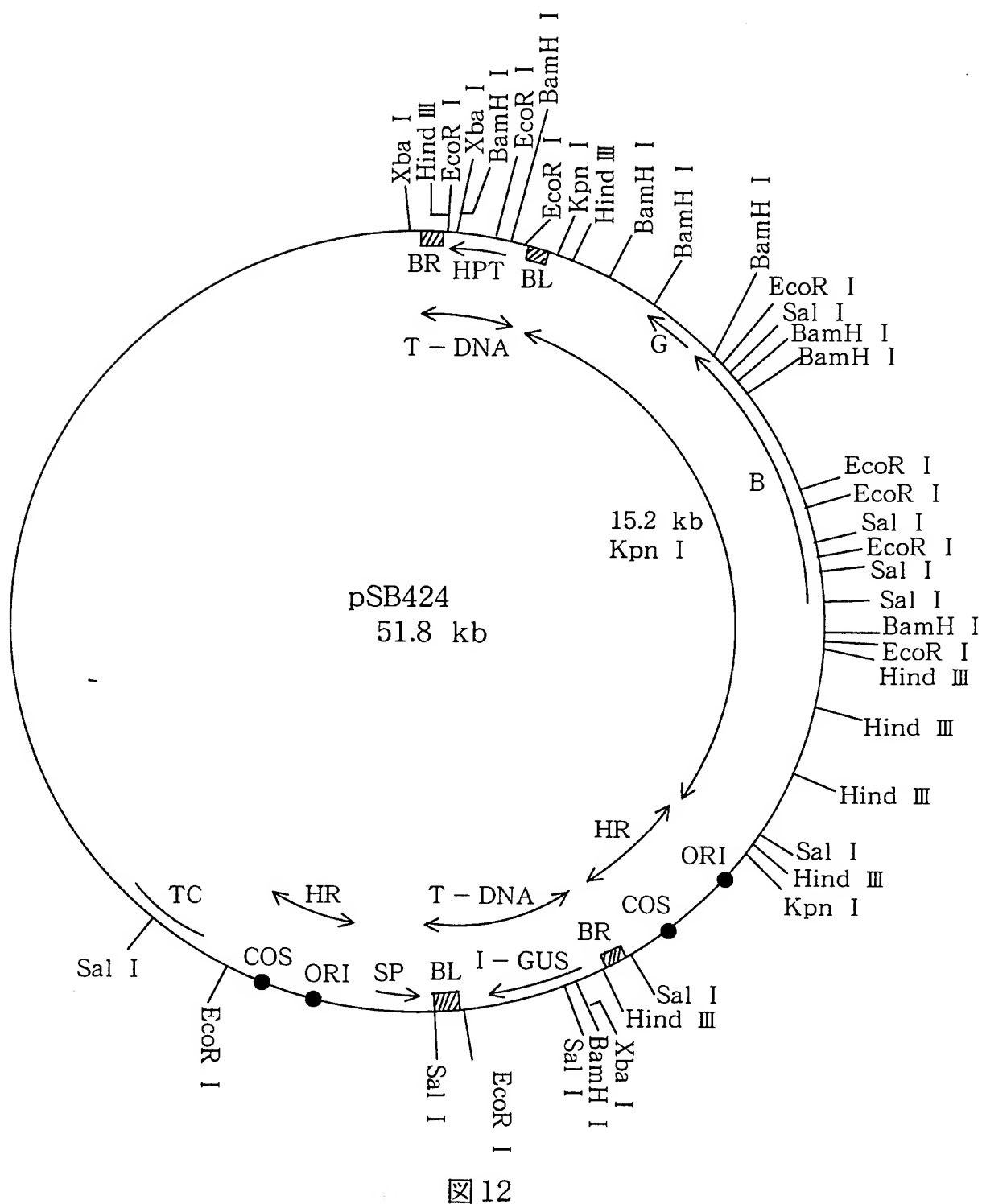


图 10





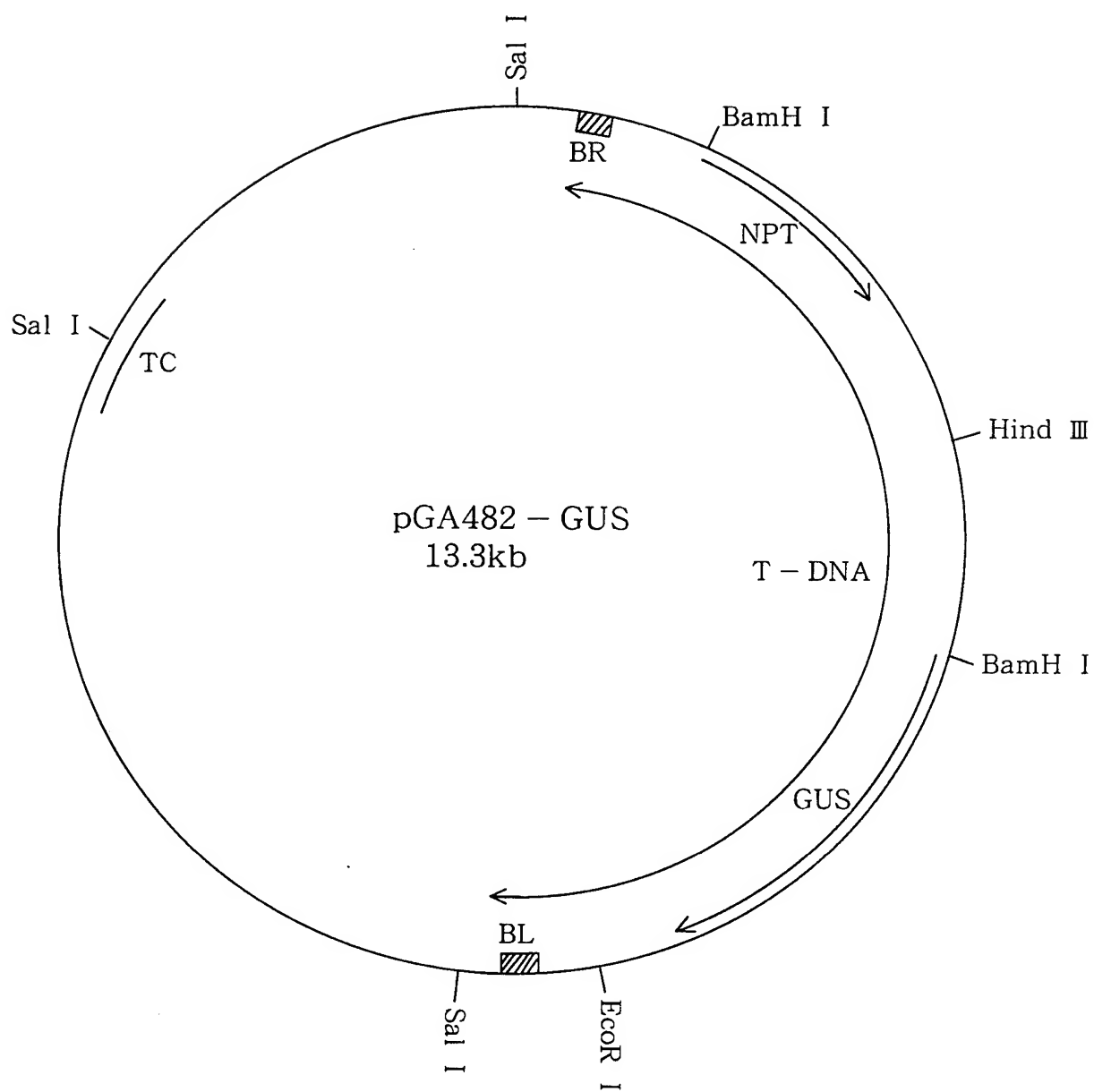


FIG 13

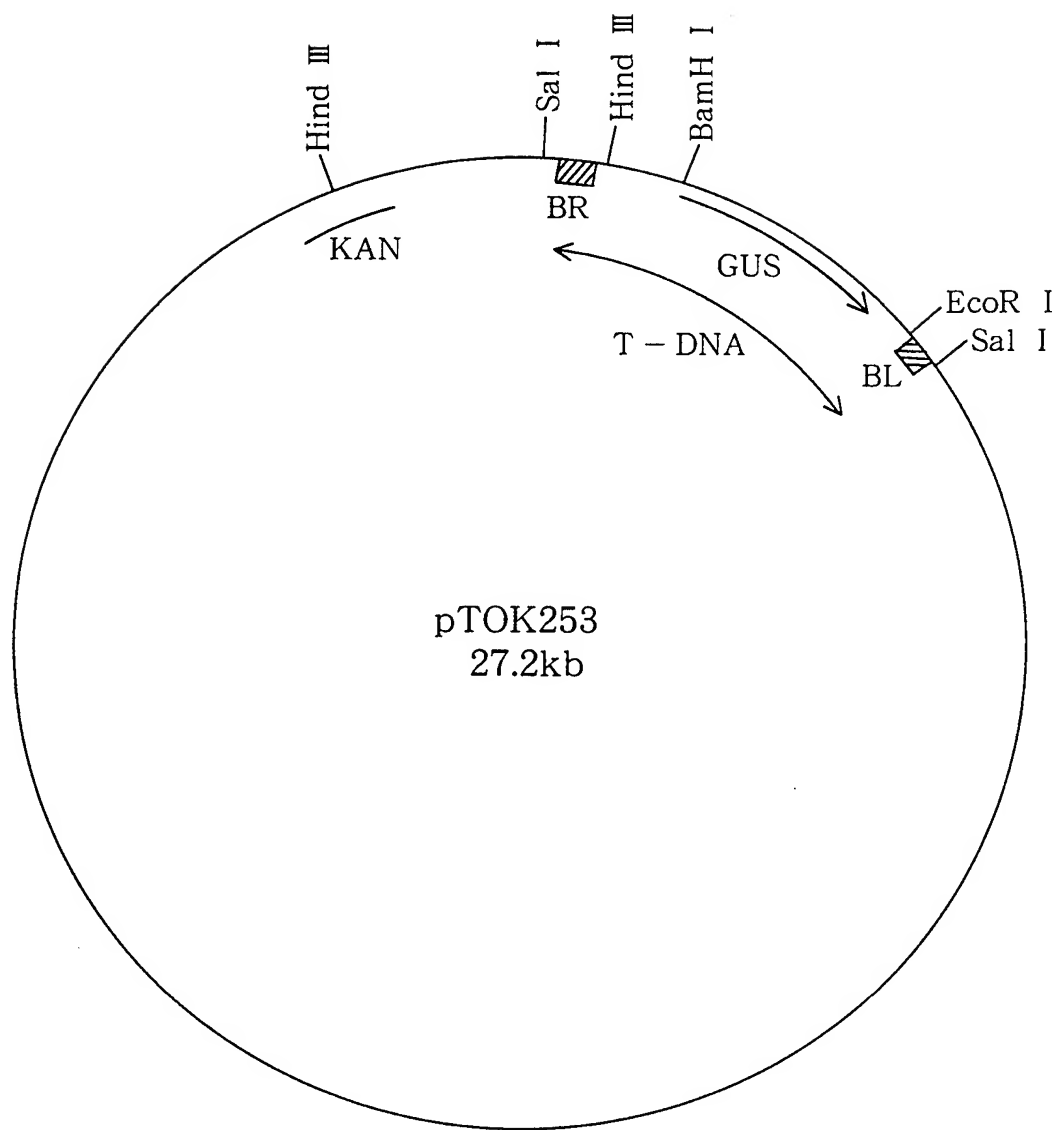


図 14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/02049

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C1⁶ C12N15/00, A01H1/00//C12N5/00, C12N1/21

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C1⁶ C12N15/00, A01H1/00//C12N5/00, C12N1/21

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS;
Agrobacterium, tumefaciens, co-transformation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Plant Cell Reports, Vol. 9, No. 2 (1990) H. Hatamoto, et al. "Recovery of morphologically normal transgenic tobacco from hairy roots co-transformed with Agrobacterium rhizogenes and a binary vector plasmid" p. 88-92	1-22
A	Theor. Appl. Genet., Vol. 82, No. 3 (1991) M. De Block, et al. "Two T-DNA'S co-transformed into Brassica napus by a double Agrobacterium tumefaciens infection are mainly integrated at the same locus" p. 257-263	1-22
A	Mol. Gen. Genet., Vol. 201, No. 3, A. Depicker, et al. "Frequencies of simultaneous transformation with different T-DNAs and their relevance to the Agrobacterium/plant cell interaction" p. 477-484	1-22

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search February 28, 1995 (28. 02. 95)	Date of mailing of the international search report March 20, 1995 (20. 03. 95)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/02049

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Mol. Gen. Genet., Vol. 202, No. 1, A. J. de Framond, et al. "Two unlinked T-DNAs can transform the same tobacco plant cell and segregate in the F1 generation" p. 125-131	1-22
A	Plant Molecular Biology, Vol. 8, No. 6 T. D. McKnight, et al. "Segregation of genes transferred to one plant cell from two separate Agrobacterium strains" p. 439-445	1-22
A	Nature, Vol. 338, K. Shimamoto, et al. "Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplasts" p. 274-276	1-22

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N15/00, A01H1/00//C12N5/00,
C12N1/21

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N15/00, A01H1/00//C12N5/00,
C12N1/21

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS;
Agrobacterium, tumefaciens, co-transformation

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Plant Cell Reports, 第9巻, 第2号 (1990) H. Hatamoto, et al. 「Recovery of morphologi- cally normal transgenic tobacco from hairy roots co-transformed with Agrobac- terium rhizogenes and a binary vector plasmid」 p.88-92	1-22
A	Theor. Appl. Genet., 第82巻, 第3号 (1991) M. De Block, et al. 「Two T-DNA 'S co-trans-	1-22

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日
若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献
(理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日
の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と
矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため
に引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規
性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文
献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性
がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28.02.95

国際調査報告の発送日

20.03.95

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

植野 浩 志

4 B 9 2 8 1

印

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	formed into <i>Brassica napus</i> by a double <i>Agrobacterium tumefaciens</i> infection are mainly integrated at the same locus」 p.257-263	
A	Mol. Gen. Genet., 第201巻, 第3号, A. Depicker, et al. 「Frequencies of simultaneous transformation with different T-DNAs and their relevance to the <i>Agrobacterium</i> /plant cell interaction」 p.477-484	1-22
A	Mol. Gen. Genet., 第202巻, 第1号, A. J. de Framond, et al. 「Two unlinked T-DNAs can transform the same tobacco plant cell and segregate in the F1 generation」 p.125-131	1-22
A	Plant Molecular Biology, 第8巻, 第6号, T. D. McKnight, et al. 「Segregation of genes transferred to one plant cell from two separate <i>Agrobacterium</i> strains」 p.439-445	1-22
A	Nature, 第338巻, K. Shimamoto, et al. 「Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplasts」 p.274-276	1-22